

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-207507

(P2003-207507A)

(43) 公開日 平成15年7月25日 (2003.7.25)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト* (参考)
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	Z 2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 25/04		A 6 1 P 25/04	
29/00		29/00	
43/00	1 0 5	43/00	1 0 5
審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全 17 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2002-313275(P2002-313275)

(22) 出願日 平成14年10月28日 (2002.10.28)

(31) 優先権主張番号 特願2001-330835(P2001-330835)

(32) 優先日 平成13年10月29日 (2001.10.29)

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72) 発明者 水島 徹

岡山県岡山市奥田西町9番11号202

(72) 発明者 成尾 憲一

兵庫県三田市南が丘1丁目1番2号

(74) 代理人 100114041

弁理士 高橋 秀一 (外1名)

Fターム(参考) 2C045 AA40 BB20 CB01 DA20 FB01

4C084 AA17 NA14 ZA082 ZB112

ZE212 ZC202

(54) 【発明の名称】 スクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 消化管粘膜障害副作用のないCOX阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法の提供。

【解決手段】 ①COX阻害作用を有する化合物の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法、②COX阻害作用を有する化合物およびネクロシス誘導剤またはアポトーシス誘導剤の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスまたはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法および③上記①または②のスクリーニング方法で得られる化合物またはその塩など。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】COX阻害作用を有する化合物の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法。

【請求項2】COX阻害作用を有する化合物の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、消化管障害の少ない非ステロイド性抗炎症化合物のスクリーニング方法。

【請求項3】消化管粘膜細胞が胃粘膜細胞である請求項1または2記載のスクリーニング方法。

【請求項4】COX阻害作用がCOX-2選択的阻害作用である請求項1または2記載のスクリーニング方法。

【請求項5】請求項1ないし4記載のスクリーニング方法で得られる、COX阻害作用を有し、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物またはその塩。

【請求項6】請求項5記載の化合物またはその塩を含有してなるCOX阻害剤。

【請求項7】疼痛または炎症性疾患の予防・治療剤である請求項6記載の剤。

【請求項8】COX阻害作用を有する化合物およびネクロシス誘導剤またはアポトーシス誘導剤の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスまたはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法。

【請求項9】消化管粘膜細胞が胃粘膜細胞である請求項8記載のスクリーニング方法。

【請求項10】COX阻害作用がCOX-2選択的阻害作用である請求項8記載のスクリーニング方法。

【請求項11】請求項8ないし10記載のスクリーニング方法で得られる、COX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物またはその塩。

【請求項12】請求項11記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬組成物。

【請求項13】ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害剤である請求項12記載の医薬組成物。

【請求項14】疼痛または炎症性疾患の予防・治療剤である請求項12記載の医薬組成物。

【請求項15】COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を0.5～2時間培養しネクロシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、ネクロシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法。

【請求項16】COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を8～48時間培養しアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、アポ

トーシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法。

【請求項17】COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を培養しネクロシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を示すIC<sub>50</sub>値が約100μM以下であり、かつネクロシス誘導作用を示すED<sub>50</sub>値が約100μM以上である化合物のスクリーニング方法。

【請求項18】COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を培養しアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を示すIC<sub>50</sub>値が約100μM以下であり、かつアポトーシス誘導作用を示すED<sub>50</sub>値が約100μM以上である化合物のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、シクロオキシゲナーゼ(COX)阻害作用を有し、消化管粘膜、特に胃粘膜細胞におけるネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物（消化管障害の少ない非ステロイド性抗炎症化合物）またはその塩のスクリーニング方法、COX阻害作用を有し、かつ消化管粘膜、特に胃粘膜細胞のネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法等に関する。

【0002】

【従来の技術】現在において、最も主要な胃潰瘍、胃炎の原因として、非ステロイド性抗炎症剤(NSAIDs)の使用が挙げられる。しかしながらその一方で、高齢化社会の進展に伴い、NSAIDsを必要とする患者は今後も増え続けることが予想される。従ってNSAIDsによる胃粘膜障害の分子機構を解明し、胃粘膜障害副作用のないNSAIDsを開発することは大変重要であると考えられる。これまでNSAIDsによる胃粘膜障害は、NSAIDsがCOXを阻害し胃粘膜防御因子であるプロスタグランジンを減少させることが原因であるとされてきた。また炎症にはCOX-2が主に発現し、胃粘膜ではCOX-1が主に発現していることからCOX-2選択的NSAIDsが胃粘膜障害のないNSAIDsになると考えられ、最近COX-2選択的NSAIDsが相次いで発売された。確かに選択性のないNSAIDsに比べ、COX-2選択的NSAIDsの胃粘膜障害は少なく、このアイデア（いわゆるCOXセオリー）は部分的には正しいと考えられる。しかし、(1)生体内で、COXを阻害する濃度と胃粘膜障害を起こす濃度には乖離がある、(2)COX-2選択的NSAIDsでも胃粘膜障害が見られる、(3)COX-2選択性と胃粘膜障害の間には、完全な相関性が見られない、等から、COX阻害に加えて、それ以外のNSAIDsによる胃粘膜障害の分子機構が存在すると考えられている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、消化管粘膜障害副作用のないCOX阻害剤の開発を目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、NSAIDsに

よる胃粘膜障害における、COX阻害による間接作用と、ネクロシス・アポトーシス誘導による直接作用の位置づけを調べるために種々検討した結果、(1)NSAIDsによるネクロシス・アポトーシスは、プロスタグランジンを添加しても影響を受けないこと（ネクロシス、アポトーシスの原因が、COX阻害でないこと、即ち直接作用と間接作用は独立したものであることを示している）、(2)COX-2選択的NSAIDsでも、*in vitro*においてネクロシス、アポトーシスは起こり、その濃度は選択性のないNSAIDsと大差がないこと、(3)選択性のないNSAIDsでも、*in vivo*での胃粘膜障害の程度には大きな差が見られるが、その胃粘膜障害（*in vivo*）と*in vitro*でのNSAIDsのネクロシス・アポトーシス誘導能との間には相関性があること、以上の点から、NSAIDsによる胃粘膜障害は、COX-1阻害によるプロスタグランジン低下を原因とする間接作用と、ネクロシス、アポトーシス誘導による直接作用（胃粘膜細胞直接障害）の両者が関与していることを見出し、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、

〔1〕COX阻害作用を有する化合物の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法（本発明のスクリーニング方法(A)）；

〔2〕COX阻害作用を有する化合物の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、消化管障害の少ない非ステロイド性抗炎症化合物のスクリーニング方法；

〔3〕消化管粘膜細胞が胃粘膜細胞である前記〔1〕または〔2〕記載のスクリーニング方法；

〔4〕COX阻害作用がCOX-2選択的阻害作用である前記

〔1〕または〔2〕記載のスクリーニング方法；

〔5〕前記〔1〕ないし〔4〕記載のスクリーニング方法で得られる、COX阻害作用を有し、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物またはその塩；

〔6〕前記〔5〕記載の化合物またはその塩を含有してなるCOX阻害剤；

〔7〕疼痛または炎症性疾患の予防・治療剤である前記〔6〕記載の剤；

〔8〕COX阻害作用を有する化合物およびネクロシス誘導剤またはアポトーシス誘導剤の存在下、消化管粘膜細胞を培養しネクロシスまたはアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法（本発明のスクリーニング方法(B)）；

〔9〕消化管粘膜細胞が胃粘膜細胞である前記〔8〕記載のスクリーニング方法；

〔10〕COX阻害作用がCOX-2選択的阻害作用である前記〔8〕記載のスクリーニング方法；

〔11〕前記〔8〕ないし〔10〕記載のスクリーニング方法で得られる、COX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物またはその塩；

〔12〕前記〔11〕記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬組成物；

〔13〕ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害剤である前記〔12〕記載の医薬組成物；

〔14〕疼痛または炎症性疾患の予防・治療剤である前記〔12〕記載の医薬組成物；

〔15〕COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を0.5～2時間培養しネクロシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、ネクロシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法；

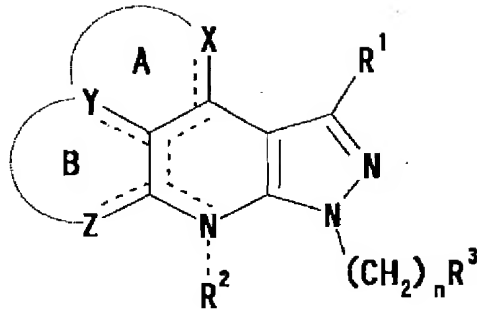
〔16〕COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を8～48時間培養しアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を有し、アポトーシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法；

〔17〕COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を培養しネクロシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を示す $IC_{50}$ 値が約100 $\mu$ M以下であり、かつネクロシス誘導作用を示す $ED_{50}$ 値が約100 $\mu$ M以上である化合物のスクリーニング方法；

〔18〕COX阻害作用を有する化合物の存在下、胃粘膜細胞を培養しアポトーシス誘導活性を検出することを特徴とする、COX阻害作用を示す $IC_{50}$ 値が約100 $\mu$ M以下であり、かつアポトーシス誘導作用を示す $ED_{50}$ 値が約100 $\mu$ M以上である化合物のスクリーニング方法等を提供するものである。

〔0005〕本発明における「COX阻害作用を有する化合物」としては、COX阻害作用を有する限りいかなる化合物をも用いることができる。化合物としては、合成化合物、発酵生産物、遺伝子産物（ペプチドまたはタンパク質）等何れであってもよい。COXとしては、COX-1、COX-2が挙げられる。「COX阻害作用を有する」とは、通常COX作用に関する50%阻害濃度( $IC_{50}$ )（COX作用を50%抑制するために必要な濃度）が約100 $\mu$ M以下である化合物をいう。具体的には、「COX阻害作用を有する化合物」としては、例えば、ジクロフェナック、インドメタシン、アスピリン、イブプロフェン、ケトプロフェン、ピロキシカム等のクラシカルNSAIDs、セレコキシブ、ロフェコキシブ、MK-663、バルデコキシブ、SC-57666、JTE-522、S-2474、SC-57666等のCOX-2選択的阻害薬、ML-3000、p54（COX inhibitor & 5-lipoxygenase inhibitor）等のデュアルインヒビター、一酸化窒素遊離型NSAID s、およびWO01/72749号公報記載の式(1)

【化1】

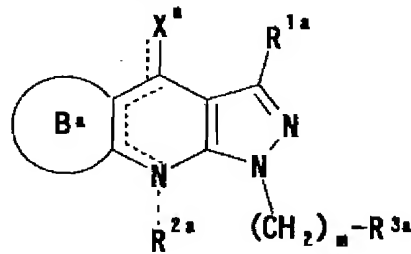


〔式中、 $R^1$ は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、置換基を有していてもよいアミノ基、置換基を有していてもよい硫黄原子またはエステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシル基、 $R^2$ は無置換、水素原子または置換基を有していてもよい炭化水素基、 $R^3$ は置換基を有していてもよい複素環基、 $X$ 、 $Y$ および $Z$ は、各々、水素、ハロゲン、ニトリル、置換基を有していてもよい炭化水素基、エステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシル基、置換基を有していてもよいアシル基、 $-NR^4R^5$ 、酸素原子、 $-OR^6$ 、硫黄原子または $-SR^7$  ( $R^4$ および $R^5$ は、各々、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基、置換基を有していてもよい複素環基または両方が一緒になってそれらが結合する窒素\*

\*原子と共に環状アミノ基もしくは複素環基を形成してもよい)あるいは $X$ と $Y$ とが一緒になって $A$ 環を、または $Y$ と $Z$ とが一緒になって $B$ 環を形成してもよい、実線と破線とで示す結合部分は単結合または二重結合のいずれか、破線で示す結合部分は単結合または無置換のいずれか、 $A$ 環は置換基を有していてもよい5ないし7員の環素または複素環、 $B$ 環は置換基を有していてもよい5ないし7員の環素または複素環、 $n$ は0または1の整数を示す〕で表わされる化合物またはその塩(以下、化合物(I)と略記することがある)等が挙げられる。

【0006】化合物(I)のなかでも、式(Ia):

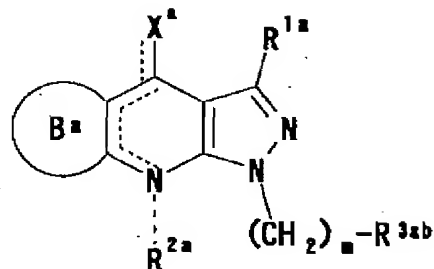
【化2】



〔式中、 $R^{1a}$ は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはエステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシル基、 $R^{2a}$ は無置換、水素原子または置換基を有していてもよい炭化水素基、 $R^{3a}$ は置換基を有していてもよい複素環基、 $X^1$ は水素、ハロゲン、ニトリル、置換基を有していてもよい炭化水素基、エステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシル基、置換基を有していてもよいアシル基、 $-NR^{4a}R^{5a}$ 、酸素原子、 $-OR^{6a}$ 、硫黄原子または $-SR^{7a}$  ( $R^{4a}$ および $R^{5a}$ は、各々、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基または両方が一緒になってそれらが結合する窒素原子と共に環状アミノ基もしくは複素環基を形成してもよい)、実線と破線とで示す結合部分は単結合または二重結合のいずれか、破線で示す結合部分は単結合または無置換のいずれか、 $B^1$ 環は置換基を有していてもよい5ないし7員の環素または複素環、 $m$ は0または1の整数を示す〕で表

わされる化合物またはその塩(以下、化合物(Ia)と略記することがある)等が好ましく、とりわけ式(Ia'):

【化3】



〔式中、 $R^{1a}$ は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基またはエステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシル基、 $R^{2a}$ は無置換、水素原子または置換基を有していてもよい炭化水素基、 $R^{3ab}$ は置換基を

有していてもよい、ヘテロ原子として2個以下の窒素原子を含む不飽和複素環基またはヘテロ原子として1個の窒素原子と1個の硫黄原子とを含む不飽和単環式複素環基、 $x^y$ は水素、ハロゲン、ニトリル、置換基を有していてもよい炭化水素基、エステル化もしくはアミド化されていてもよいカルボキシ基、置換基を有していてもよいアシル基、 $-NR^{1*}R^{2*}$ 、酸素原子、 $-OR^{1*}$ 、硫黄原子または $-SR^{1*}$  ( $R^{1*}$ および $R^{2*}$ は、各々、水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基または両方が一緒になってそれらが結合する窒素原子と共に環状アミノ基もしくは複素環基を形成してもよい)、実線と破線とで示す結合部分は単結合または二重結合のいずれか、破線で示す結合部分は単結合または無置換のいずれか、 $R^x$ 環は置換基を有していてもよい5ないし7員の環素または複素環、 $m$ は0または3の整数を示す]で表わされる化合物またはその塩(以下、化合物(Ia'))と略記することがある)等が好ましい。

【0007】以下、化合物(I)について詳述する。本明細書中で用いられる用語「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「炭化水素基」としては、例えば、脂肪族炭化水素基、単環式飽和炭化水素基および芳香族炭化水素基等があげられ、炭素数1ないし16個のものが好ましい。具体的には、例えば、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基、アリール基等が用いられる。「アルキル基」は、例えば、低級アルキル基等が好ましく、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル等の $C_{1-6}$ アルキル基等が汎用される。「アルケニル基」は、例えば、低級アルケニル基等が好ましく、例えば、ビニル、1-プロペニル、アリル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル等の $C_{2-4}$ アルケニル基等が汎用される。「アルキニル基」は、例えば、低級アルキニル基等が好ましく、例えば、エチニル、プロパルギル、1-プロピニル等の $C_{2-3}$ アルキニル基等が汎用される。「シクロアルキル基」は、例えば、低級シクロアルキル基等が好ましく、例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等の $C_{3-6}$ シクロアルキル基等が汎用される。「アリール基」は、例えば、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、ビフェニル、2-インデニル、2-アンスリル等の $C_{6-11}$ アリール基等が好ましく、例えば、フェニル基等が汎用される。

【0008】「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「炭化水素基」が有していてもよい置換基としては、例えば、ハロゲン原子(例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素等)、ニトロ基、シアノ基、ヒドロキシ基、ハロゲン化されていてもよい低級アルキル基(例えば、メチル、クロロメチル、ジフルオロメチル、トリクロロメチル、トリフルオロメチル、エチル、2-ブromoエチル、2,2,2-トリフルオロエチル、ペンタフルオロエチル、ブ

ロピル、3,3,3-トリフルオロプロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、4,4,4-トリフルオロブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、5,5,5-トリフルオロペンチル、ヘキシル、6,6,6-トリフルオロヘキシル等のハロゲン化されていてもよい $C_{1-6}$ アルキル基等)、低級アルコキシ基(例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、シクロプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、シクロブトキシ、ペンチルオキシ、シクロペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、シクロヘキシルオキシ等の $C_{1-6}$ アルコキシ基等)、アミノ基、モノ-低級アルキルアミノ基(例えば、メチルアミノ、エチルアミノ等のモノ- $C_{1-2}$ アルキルアミノ基等)、ジ-低級アルキルアミノ基(例えば、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ等のジ- $C_{1-2}$ アルキルアミノ基等)、カルボキシ基、低級アルキルカルボニル基(例えば、アセチル、プロピオニル等の $C_{1-3}$ アルキルカルボニル基等)、低級アルコキシカルボニル基(例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル等の $C_{1-4}$ アルコキシカルボニル基等)、カルバモイル基、モノ-低級アルキルカルバモイル基(例えば、メチルカルバモイル、エチルカルバモイル等のモノ- $C_{1-2}$ アルキルカルバモイル基等)、ジ-低級アルキルカルバモイル基(例えば、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル等のジ- $C_{1-2}$ アルキルカルバモイル基等)、アリールカルバモイル基(例えば、フェニルカルバモイル、ナフチルカルバモイル等の $C_{6-11}$ アリールカルバモイル基等)、アリール基(例えば、フェニル、ナフチル等の $C_{6-11}$ アリール基等)、アリールオキシ基(例えば、フェニルオキシ、ナフチルオキシ等の $C_{6-11}$ アリールオキシ基等)、ハロゲン化されていてもよい低級アルキルカルボニルアミノ基(例えば、アセチルアミノ、トリフルオロアセチルアミノ等のハロゲン化されていてもよい $C_{1-3}$ アルキルカルボニルアミノ基等)等が用いられる。該「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「炭化水素基」は、前記の置換基を、炭化水素基の置換可能な位置に1ないし5個、好ましくは1ないし3個有していてもよく、置換基数が2個以上の場合、各置換基は同一または異なってもよい。

【0009】本明細書中で用いる用語「置換基を有していてもよい複素環基」の「複素環基」としては、例えば、炭素原子以外に窒素原子、酸素原子および硫黄原子から選ばれた1種または2種1ないし4個(好ましくは1ないし3個)のヘテロ原子を含む5ないし14員(好ましくは5ないし10員)の(単環式ないし3環式、好ましくは単環式または2環式)複素環基等があげられる。例えば、2-または3-チエニル、3-フリル、1-、2-または3-ピロリル、1-、2-または3-ピロリジニル、2-、4-または5-オキサゾリル、3-、4-または5-イソオキサゾリル、2-、4-または5-チアゾリル、3-、4-または5-イソチアゾリル、3

、4-または5-ピラゾリル、2-, 3-または4-ピラゾリジニル、2-, 4-または5-イミダゾリル、1,2,3-トリアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、1H-または2H-テトラゾリル等の炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む5員環基、例えば、2-, 3-または4-ピリジニル、N-オキシド-2-, 3-または4-ピリジニル、2-, 4-または5-ピリミジニル、N-オキシド-2-, 4-または5-ピリミジニル、チオモルホリニル、モルホリニル、ビペリジノ、2-, 3-または4-ビペリジニル、チオピラニル、1,4-オキサジニル、1,4-チアジニル、1,3-チアジニル、ビペラジニル、トリアジニル、3-または4-ピリダジニル、ピラジニル、N-オキシド-3-または4-ピリダジニル等の炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む6員環基、例えば、インドリル、ベンゾフリル、ベンズオキサゾリル、ベンズイミダゾリル、キノリニル、イソキノリニル、フタラジニル、キナゾリニル、キノキサリニル、インドリジニル、キノリジニル、1,8-ナフチリジニル、ジベンゾフラニル、カルバゾリル、アクリジニル、フェナントリジニル、クロマニル、フェノチアジニル、フェノキサジニル等の炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし4個含む2環性または3環性縮合環基（好ましくは、前記の5または6員環が炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれるヘテロ原子を1ないし4個含んでいてもよい5または6員環基または2個と縮合して形成される基）等が用いられる。中でも、炭素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれるヘテロ原子を1ないし3個含む5ないし7員（好ましくは5または6員）の複素環基が好ましい。

【0010】該「置換基を有していてもよい複素環基」の「複素環基」が有していてもよい置換基としては、例えば、ハロゲン原子（例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素等）、低級アルキル基（例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシル等の $C_{1-6}$ アルキル基等）、シクロアルキル基（例えば、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル等の $C_{3-6}$ シクロアルキル基等）、低級アルキニル基（例えば、エチニル、1-プロピニル、プロパルギル等の $C_{2-3}$ アルキニル基等）、低級アルケニル基（例えば、ビニル、アリル、イソプロベニル、ブテニル、イソブテニル等の $C_{2-4}$ アルケニル基等）、アラルキル基（例えば、ベンジル、 $\alpha$ -メチルベンジル、フェネチル等の $C_{7-11}$ アラルキル基等）、アリール基（例えば、フェニル、ナフチル等の $C_{6-10}$ アリール基等、好ましくはフェニル基）、低級アルコキシ基（例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ等の $C_{1-4}$ アルコキシ基等）、アリールオキシ基（例えば、フェノキシ等の $C_{6-10}$ アリール

ルオキシ基等）、低級アルカノイル基（例えば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル等の $C_{1-4}$ アルカノイル基等）、アリールカルボニル（例えば、ベンゾイル基、ナフトイル基等の $C_{6-10}$ アリールカルボニル基等）、低級アルカノイルオキシ基（例えば、ホルミルオキシ、アセチルオキシ、プロピオニルオキシ、ブチリルオキシ、イソブチリルオキシ等の $C_{1-4}$ アルカノイルオキシ基等）、アリールカルボニルオキシ基（例えば、ベンゾイルオキシ、ナフトイルオキシ等の $C_{6-10}$ アリールカルボニルオキシ基等）、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基（例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、イソプロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、イソブトキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニル等の $C_{1-4}$ アルコキシカルボニル基等）、アラルキルオキシカルボニル（例えば、ベンジルオキシカルボニル等の $C_{7-11}$ アラルキルオキシカルボニル基等）、カルバモイル基、モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲノ-低級アルキル基（例えば、クロロメチル、ジクロロメチル、トリフルオロメチル、2,2,2-トリフルオロエチル等のモノ-、ジ-またはトリ-ハロゲノ- $C_{1-4}$ アルキル基等）、オキソ基、アミジノ基、イミノ基、アミノ基、モノ-低級アルキルアミノ基（例えば、メチルアミノ、エチルアミノ、プロピルアミノ、イソプロピルアミノ、ブチルアミノ等のモノ- $C_{1-4}$ アルキルアミノ基等）、ジ-低級アルキルアミノ基（例えば、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、ジプロピルアミノ、ジイソプロピルアミノ、ジブチルアミノ等のジ- $C_{1-4}$ アルキルアミノ基等）、炭素原子と1個の窒素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし3個含んでいてもよい3ないし6員の環状アミノ基（例えば、アジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ピロリニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、イミダゾリジニル、ビペリジニル、モルホリニル、ジヒドロピリジニル、ピリジニル、N-メチルビペラジニル、N-エチルビペラジニル等の3ないし6員の環状アミノ基等）、アルキレンジオキシ基（例えば、メチレンジオキシ、エチレンジオキシ等の $C_{1-2}$ アルキレンジオキシ基等）、ヒドロキシル基、ニトロ基、シアノ基、メルカプト基、スルホ基、スルフィノ基、ホスホノ基、スルファモイル基、モノアルキルスルファモイル基（例えば、N-メチルスルファモイル、N-エチルスルファモイル、N-プロピルスルファモイル、N-イソプロピルスルファモイル、N-ブチルスルファモイル等のモノ- $C_{1-4}$ アルキルスルファモイル基等）、ジアルキルスルファモイル基（例えば、N,N-ジメチルスルファモイル、N,N-ジエチルスルファモイル、N,N-ジプロピルスルファモイル、N,N-ジブチルスルファモイル等のジ- $C_{1-4}$ アルキルスルファモイル基等）、アルキルチオ基（例えば、メチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、sec-ブチルチオ、tert-ブチルチオ等

の $C_{1-6}$ アルキルチオ基等)、アリールチオ基(例えば、フェニルチオ、ナフチルチオ等の $C_{6-10}$ アリールチオ基等)、低級アルキルスルフィニル基(例えば、メチルスルフィニル、エチルスルフィニル、プロピルスルフィニル、イソプロピルスルフィニル、ブチルスルフィニル等の $C_{1-4}$ アルキルスルフィニル基等)、アリールスルフィニル基(例えば、フェニルスルフィニル、ナフチルスルフィニル等の $C_{6-10}$ アリールスルフィニル基等)、低級アルキルスルホニル基(例えば、メチルスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、イソプロピルスルホニル、ブチルスルホニル等の $C_{1-4}$ アルキルスルホニル基等)、アリールスルホニル基(例えば、フェニルスルホニル、ナフチルスルホニル等の $C_{6-10}$ アリールスルホニル基等)等が用いられる。該「置換基を有しているもよい複素環基」の「複素環基」は、前記の置換基を、複素環基の置換可能な位置に1ないし5個、好ましくは1ないし3個有しているもよく、置換基数が2個以上の場合は、各置換基は同一または異なっているもよい。

【0011】本明細書中で用いる用語「置換基を有しているもよいアミノ基」は、置換基として、例えば、前記「置換基を有しているもよい炭化水素基」等を1または2個有しているもよいアミノ基等があげられる。この「アミノ基」が有しているもよい置換基の好ましいものとしては、例えば、置換基を有しているもよい $C_{1-6}$ アルキル基、置換基を有しているもよい $C_{6-10}$ アリール基等である。該「 $C_{1-6}$ アルキル基」、「 $C_{6-10}$ アリール基」が有しているもよい置換基としては、前記「炭化水素基」が有しているもよい置換基と同様のものが用いられる。本明細書中で用いる用語「置換基を有しているもよい低級アルキル基」の「低級アルキル基」は、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチルなどの $C_{1-4}$ アルキル基等を示し、置換基として、例えば、前記「炭化水素基」が有しているもよい置換基等を1ないし3個有しているもよい。本明細書中で用いる用語「置換基を有しているもよい低級アルコキシ基」の「低級アルコキシ基」は、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシおよびtert-ブトキシ等の $C_{1-4}$ アルコキシ基等を示し、置換基として、例えば、前記「炭化水素基」が有しているもよい置換基等を1ないし3個有しているもよい。本明細書中で用いる用語「置換基を有しているもよいベンゼン環」としては、例えば、ハロゲン原子(例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素等)、置換基を有しているもよい炭化水素基、置換基を有しているもよいアミノ基、アミド基(例えば、アセトアミド等の $C_{1-6}$ アシルアミノ基、好ましくは $C_{1-4}$ アルカノイルアミノ基等)、置換基を有しているもよい低級アルコキシ基、低級アルキレンジオキシ基(例えば、メチレンジオキシ、エチレンジオキシ等の $C_{1-4}$ アルキレンジオキシ基等)、および前記の「置換基

を有しているもよい複素環基」の「複素環基」が有しているもよい置換基と同様な基等から選ばれる同一または異なった1ないし3個(好ましくは1または2個)の置換基を置換可能な位置に有しているもよいベンゼン環を示す。これらの「置換基を有しているもよい炭化水素基」、「置換基を有しているもよいアミノ基」および「置換基を有しているもよい低級アルコキシ基」としては、例えば、前記で詳細に説明したものと同様のものが用いられる。これらの「炭化水素基」、「アミノ基」および「低級アルコキシ基」が有する置換基の数が2個以上の場合、各置換基は同一または異なっているもよい。該「置換基を有しているもよいベンゼン環」は、例えば、ハロゲン原子(例えば、フッ素、塩素等)、 $C_{1-6}$ アルキル基(例えば、メチル、エチル等)、およびモノ- $C_{1-6}$ アルキルアミノ基から選ばれた1ないし3個の置換基で置換されているもよいベンゼン環等が好ましい。本明細書中で用いる用語「置換基を有しているもよい硫黄原子」は、 $-SR^d$ で表される基を示す。ここで、 $R^d$ は水素原子、置換基を有しているもよい炭化水素基または置換基を有しているもよい複素環基を示す。

【0012】本明細書中で用いる用語「エステル化されているもよいカルボキシル基」は $-COOR^e$ で表わされる基を示す。ここに、 $R^e$ は水素原子または置換基を有しているもよい炭化水素基を示す。また、本明細書中で用いる用語「アミド化されているもよいカルボキシル基」は $-CONR^fR^g$ で表わされる基を示す。ここで、 $R^f$ および $R^g$ は、各々、水素原子、置換基を有しているもよい炭化水素基または両方が一緒になって、それらが結合する窒素原子と共に環状アミノ基もしくは複素環基を形成してもよい。本明細書中で用いる用語「置換基を有しているもよいアシル基」は $-COR^h$ 、 $-SOR^h$ および $-SO_2R^h$ で表わされる基を示す。ここで $R^h$ は、前記した「置換基を有しているもよい炭化水素基」、「置換基を有しているもよい複素環基」を示す。本明細書中で、 $-NR^fR^g$ において、「 $R^f$ と $R^g$ の両方が一緒になってそれらが結合する窒素原子と共に形成する環状アミノ基」および $-CONR^fR^g$ において、「 $R^f$ と $R^g$ の両方が一緒になってそれらが結合する窒素原子と共に形成する環状アミノ基」としては、例えば、炭素原子と1個の窒素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし3個含んでもよい3ないし6員の環状アミノ基(例えば、アジリジニル、アゼチジニル、ピロリジニル、ピロリニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、イミダゾリジニル、ピベリジニル、モルホリニル、ジヒドロピリジニル、ピリジニル、N-メチルピベラジニル、N-エチルピベラジニル等の3ないし6員の環状アミノ基等)等を示す。好ましくは、 $R^h$ の複素環基は含窒素芳香複素環基、特に、6員の含窒素芳香複素環基、例えば、ピリジン環である。その置換基としては、前記の「置換基を有しているもよい複素環基」についての置換基でよく、また、 $R^e$ とし

て、その含窒素複素環基とベンゼン環とが縮合してキノリン環を形成してもよい。また、Xは水素原子、酸素原子、 $-OR^*$ （ここで、 $R^*$ は水素原子または置換基を有しているもよい炭化水素基）または置換基を有しているもよい炭化水素基が好ましい。Yは水素原子、置換基を有しているもよい炭化水素基、 $-COR^*$ または $-COOR^*$ が好ましく、 $-COR^*$ または $-COOR^*$ がより好ましい。Zは水素原子、酸素原子、 $-OR^*$ または置換基を有しているもよい炭化水素基（ここで、 $R^*$ は水素原子または置換基を有しているもよい炭化水素基）が好ましい。A環またはB環で表される「置換基を有しているもよい5ないし7員の同素または複素環」の同素環としては、例えば、シクロペンタン、シクロヘキサン、シクロヘプタン、シクロペンテン、シクロペンタジエン、シクロヘキセン、シクロヘキサジエン、ベンゼン、シクロヘプテン、シクロヘプタンジエン等が挙げられ、なかでもベンゼン、シクロペンタン、シクロヘキサン、シクロヘプタンが好ましく、とりわけベンゼンが好ましい。A環またはB環で表される「置換基を有しているもよい5ないし7員の同素または複素環」の複素環としては、例えば、フラン、チオフェン、ピロール、オキサゾール、イソオキサゾール、チアゾール、イソチアゾール、イミダゾール、ピラゾール、オキサジアゾール、フラザン、チアジアゾール、トリアゾール、ビリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、トリアジン等の芳香族複素環、アゼチジン、オキセタン、ピロリジン、ピベリジン、テトラヒドロピラン、モルホリン、チオモルホリン、ピベラジン等の非芳香族複素環、あるいは芳香族複素環の一部または全部の二重結合が飽和した非芳香族複素環等が挙げられる。A環またはB環で表される「置換基を有しているもよい5ないし7員の同素または複素環」の置換基としては、前記の「置換基を有しているもよい複素環基」の置換基と同様の数、同様のものが挙げられる。nは0が好ましい。

【0013】好ましくは、 $R^{**}$ の複素環基はヘテロ原子として2個以下の窒素原子を含む不飽和複素環基またはヘテロ原子として1個の窒素原子と1個の硫黄原子を含む不飽和単環式複素環基、さらに好ましくは含窒素芳香複素環基、特に、6員の含窒素芳香複素環基、例えば、ビリジン環である。その置換基としては、前記の「置換基を有しているもよい複素環基」についての置換基でよく、また、 $R^{**}$ として、その含窒素複素環基とベンゼン環とが縮合してキノリン環を形成してもよい。 $R^{**}$ のヘテロ原子として2個以下の窒素原子を含む不飽和複素環基またはヘテロ原子として1個の窒素原子と1個の硫黄原子を含む不飽和単環式複素環基として、好ましくは含窒素芳香複素環基、特に、6員の含窒素芳香複素環基、例えば、ビリジン環が挙げられる。その置換基としては、前記の「置換基を有しているもよい複素環基」についての置換基でよく、また、 $R^{**}$ として、その含窒素複素環基とベンゼン環とが縮合してキノリン環を形成して

もよい。また、 $X^*$ は酸素原子または $-OR^{**}$ （ $R^{**}$ は水素原子または置換基を有しているもよい炭化水素基）が好ましく、B環およびB'環としては置換基を有しているもよいベンゼン環が好ましく、特に、 $R^{**}$ または $R^{**b}$ が置換基を有しているもよい含窒素芳香複素環基でB'環が置換基を有しているもよいベンゼン環の化合物(Ia)または(Ia')が好ましい。mは0が好ましい。

【0014】化合物(I)、(Ia)または(Ia')の好ましい実施態様を以下に示す。

- 10 ・  $R^*$ が無置換または水素原子で、XとYとが一緒になってA環を形成しているもよい化合物(I)
- ・  $R^*$ が置換基を有しているもよい、ヘテロ原子として1個の窒素原子のみを含む不飽和複素環基で、nが0である化合物(I)
- ・ YおよびZがB環を形成し、B環が置換基を有しているもよい5ないし7員の同素または複素環である化合物(I)
- ・  $R^*$ および $R^*$ の炭化水素基が、各々、脂肪族炭化水素基、単環式飽和炭化水素基または芳香族炭化水素基である化合物(I)
- 20 ・  $R^*$ および $R^*$ の炭化水素基が、各々、炭素数1ないし16の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基またはアリール基である化合物(I)
- ・ A環またはB環の同素または複素環基が、単環式飽和炭化水素、ベンゼン環、ビリジン環またはチオフェン環である化合物(I)
- ・ Xが水素原子、酸素原子、 $-OR^*$ （ $R^*$ は前記と同意義を示す。）または置換基を有しているもよい炭化水素基である化合物(I)
- ・ Yが $-COR^*$ または $-COOR^*$ （ $R^*$ および $R^*$ は前記と同意義を示す。）である化合物(I)
- 30 ・ Zが水素原子、酸素原子、 $-OR^*$ （ $R^*$ は前記と同意義を示す。）または置換基を有しているもよい炭化水素基である化合物(I)
- ・  $R^{**}$ および $R^{**}$ の炭化水素基が、各々、脂肪族炭化水素基、単環式飽和炭化水素基または芳香族炭化水素基である化合物(Ia)
- ・  $R^{**}$ および $R^{**}$ の炭化水素基が、各々、炭素数1ないし16の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基またはアリール基である化合物(Ia)
- 40 ・ B'環の同素または複素環基が、単環式飽和炭化水素、ベンゼン環、ビリジン環またはチオフェン環である化合物(Ia)
- ・  $X^*$ が水素原子、酸素原子、 $-OR^{**}$ （ $R^{**}$ は前記と同意義を示す。）または置換基を有しているもよい炭化水素基である化合物(Ia)
- ・  $R^{**}$ および $R^{**}$ が、各々、炭素数1ないし16の、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、シクロアルキル基またはアリール基である化合物(Ia')
- ・  $R^{**b}$ が(1)ハロゲン原子、(2)低級アルキル基、(3)シクロアルキル基、(4)低級アルキニル基、(5)低級アルケ



ニル基、(6)アラルキル基、(7)アリール基、(8)低級アルコキシ基、(9)アリールオキシ基、(10)低級アルカノイル基、(11)アリールカルボニル、(12)低級アルカノイルオキシ基、(13)アリールカルボニルオキシ基、(14)カルボキシ基、(15)低級アルコキシカルボニル基、(16)アラルキルオキシカルボニル基、(17)カルバモイル基、(18)モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲン-低級アルキル基、(19)アミジノ基、(20)アミノ基、(21)モノ-低級アルキルアミノ基、(22)ジ-低級アルキルアミノ基、(23)炭素原子と1個の窒素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし3個含んでもよい3ないし6員の環状アミノ基、(24)アルキレンジオキシ基、(25)ヒドロキシ基、(26)ニトロ基、(27)シアノ基、(28)メルカプト基、(29)スルホ基、(30)スルフィノ基、(31)ホスホ基、(32)スルファモイル基、(33)モノアルキルスルファモイル基、(34)ジアルキルスルファモイル基、(35)アルキルチオ基、(36)アリールチオ基、(37)低級アルキルスルフィニル基、(38)アリールスルフィニル基、(39)低級アルキルスルホニル基または(40)アリールスルホニル基で置換されていてもよいピリジニルである化合物(Ia') )

・X\*が酸素原子または-OR\* (R\*は水素原子または(1)ハロゲン原子、(2)ニトロ基、(3)シアノ基、(4)ヒドロキシ基、(5)ハロゲン化されていてもよい低級アルキル基、(6)低級アルコキシ基、(7)アミノ基、(8)モノ-低級アルキルアミノ基、(9)ジ-低級アルキルアミノ基、(10)カルボキシ基、(11)低級アルキル-カルボニル基、(12)低級アルコキシ-カルボニル基、(13)カルバモイル基、(14)モノ-低級アルキルカルバモイル基、(15)ジ-低級アルキルカルバモイル基、(16)アリールカルバモイル基、(17)アリール基、(18)アリールオキシ基または(19)ハロゲン化されていてもよい低級アルキルカルボニルアミノ基で置換されていてもよい炭化水素基)である化合物(Ia') )

・R\*\*が含窒素芳香複素環基で、R\*環が(1)ハロゲン原子、(2)置換基を有していてもよい炭化水素基、(3)置換基を有していてもよいアミノ基、(4)置換基を有していてもよい低級アルコキシ基、(5)低級アルキレンジオキシ基、(6)アリールオキシ基、(7)低級アルカノイル基、(8)アリールカルボニル基、(9)低級アルカノイルオキシ基、(10)アリールカルボニルオキシ基、(11)カルボキシ基、(12)低級アルコキシカルボニル基、(13)アラルキルオキシカルボニル基、(14)カルバモイル基、(15)モノ-、ジ-またはトリ-ハロゲン-低級アルキル基、(16)アミジノ基、(17)アミノ基、(18)モノ-低級アルキルアミノ基、(19)ジ-低級アルキルアミノ基、(20)炭素原子と1個の窒素原子以外に酸素原子、硫黄原子および窒素原子から選ばれたヘテロ原子を1ないし3個含んでもよい3ないし6員の環状アミノ基、(21)アルキレンジオキシ基、(22)ヒドロキシ基、(23)ニトロ基、(24)シアノ

基、(25)メルカプト基、(26)スルホ基、(27)スルフィノ基、(28)ホスホ基、(29)スルファモイル基、(30)モノアルキルスルファモイル基、(31)ジアルキルスルファモイル基、(32)アルキルスルファニル基、(33)アリールスルファニル基、(34)低級アルキルスルフィニル基、(35)アリールスルフィニル基、(36)低級アルキルスルホニル基または(37)アリールスルホニル基で置換されていてもよいベンゼン環である化合物(Ia') )

特に好ましい化合物(Ia)または(Ia') )としては、例えば、6,7-ジフルオロ-3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン、3-メチル-1-(2-ピリジニル)-6-トリフルオロメチル-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン、6-フルオロ-3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン、7-フルオロ-3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン、3-エチル-6,7-ジフルオロ-1-(2-ピリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン、6,7-ジフルオロ-3-メチル-1-(3-ピリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン、6,7-ジフルオロ-3-メチル-1-(6-メチル-2-ピリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン、6,7-ジフルオロ-3-メチル-1-(6-フェニル-2-ピリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン、5-フルオロ-3-メチル-1-(2-ピリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オンおよび1-(2-ピリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン等が挙げられる。

【0015】化合物(I)、(Ia)および(Ia') の塩としては、例えば、薬理学的に許容される塩等が用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩等が挙げられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩等が挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、シクロヘキシルアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N-ジベンジルエチレンジアミン等との塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等との塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えば、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等との塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アルギニン、リジン、オルニチン等との塩が挙げ

られ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸等との塩が挙げられる。とりわけ、薬学的に許容可能な塩が好ましく、その例としては、化合物(I)、(Ia)および(Ia')内に塩基性官能基を有する場合には、例えば、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等無機酸との塩、例えば、酢酸、フタル酸、フマル酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機酸との塩が挙げられ、酸性官能基を有する場合には、例えば、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、アンモニウム塩等が挙げられる。

【0016】化合物(I)、(Ia)および(Ia')は、例えばW001/72749号公報に記載の方法に従って製造することができる。

【0017】本発明で用いられる「COX阻害作用を有する化合物」としては、上記の例示に限られるものではなく、例えば、以下のスクリーニングにおいてCOX阻害作用を有すると認められる化合物も用いることができる。

(COX阻害作用のスクリーニング) COX-1またはCOX-2を含有するミクロソーム画分、捕囚因子(1 M Tris-HCl (pH 8.0)、50 mM EDTA、1.0 % Tween 20、50 mM ルミノール、100 mM hematin)を混合後、試験化合物を添加し、37°Cで25分間静置する。アラキドン酸(20 mM)を添加することにより反応を開始させ、アラキドン酸添加直後から10秒間の化学発光量をルミスター(Lumistar (BMG Labtechnologies GmbH))を用いて計測する。対照化合物としてflurbiprofen (4 mM)を添加時の酵素活性を0 %、対照化合物および試験化合物を無添加時の酵素活性を100 %とし、酵素活性に関する50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>) (酵素活性を50%抑制するために必要な濃度)が約100 μM以下である化合物を「COX阻害作用を有する化合物」とする。

【0018】また、COX阻害作用は、COX-2選択的阻害作用であるものがより好ましい。

【0019】本発明のスクリーニング方法(A)は、消化管粘膜細胞、特に胃粘膜細胞培養系を用いて、COX阻害作用を有する化合物の中からネクロシスおよび/またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物を選択する方法である。ネクロシスおよび/またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物とは、例えば、ネクロシスおよび/またはアポトーシス誘導に関する50%有効濃度(ED<sub>50</sub>) (50%の細胞にネクロシスおよび/またはアポトーシスを誘導するために必要な濃度)が約100 μM以上である化合物をいう。以下に本発明のスクリーニング方法(A)について詳述する。

【0020】胃粘膜細胞の調整法

モルモット(雄四週齢)から取り出した胃を切開し、洗浄後、胃粘膜細胞を剥離する。細胞は、アクチナーゼ、コレグナーゼ処理後、コラーゲンコートしたシャーレで、0.3%牛血清存在下で12時間培養する。浮遊細胞を

除去した後、以下のアポトーシス、ネクロシスのアッセイに用いる。

【0021】1. COX阻害作用を有し、ネクロシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法

膜の透過性変化を指標に、種々のNSAIDsが胃粘膜細胞においてネクロシスを誘導する条件を検討し、1時間NSAIDs処理で見られる細胞死がネクロシスであることが見出されている(Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281, G1092-G1100, 2001)。検査対象のNSAIDsの0.5~2時間(好ましくは1時間)処理における細胞死を、トリバンプルー染色法(Diq. Dis. Sci. 45, 1674-1679, 2000)、及びMTT法(Biol. Pharm. Bull. 24, 887-891, 2001)で調べることににより、ネクロシスを検出することができる。この検出方法で、試験化合物のネクロシス誘導に関する50%有効濃度(ED<sub>50</sub>) (50%の細胞にネクロシスを誘導するために必要な濃度)を算出することができる。試験化合物のネクロシス誘導作用を示すED<sub>50</sub>値と、COX阻害作用を示すIC<sub>50</sub>値とを比較し、(ネクロシス誘導作用を示すED<sub>50</sub>値)を(COX阻害作用を示すIC<sub>50</sub>値)で除した値が大きければ大きいほど「COX阻害作用を有し、ネクロシス誘導作用の弱い化合物」である。該「COX阻害作用を有し、ネクロシス誘導作用の弱い化合物」として好ましくは、COX阻害作用を示すIC<sub>50</sub>値が約100 μM以下かつネクロシス誘導作用を示すED<sub>50</sub>値が約100 μM以上である化合物であり、より好ましくは、COX阻害作用を示すIC<sub>50</sub>値が約20 μM以下で、かつネクロシス誘導作用を示すED<sub>50</sub>値が約100 μM以上である化合物である。

【0022】2. COX阻害作用を有し、アポトーシス誘導作用の弱い化合物のスクリーニング方法

DNAの断片化、クロマチンの凝集、caspaseの活性化を指標に、種々のNSAIDsが胃粘膜細胞においてアポトーシスを誘導する条件を検討し、16時間NSAIDs処理で見られる細胞死がアポトーシスであることが見出されている(Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281, G1092-G1100, 2001)。検査対象のNSAIDsの8~48時間(好ましくは12~24時間、より好ましくは16時間)処理における細胞死を、トリバンプルー染色法(Diq. Dis. Sci. 45, 1674-1679, 2000)、及びMTT法(Biol. Pharm. Bull. 24, 887-891, 2001)で調べることににより、アポトーシスを検出することができる。この検出方法で、試験化合物のアポトーシス誘導に関する50%有効濃度(ED<sub>50</sub>) (50%の細胞にアポトーシスを誘導するために必要な濃度)を算出することができる。試験化合物のアポトーシス誘導作用を示すED<sub>50</sub>値と、COX阻害作用を示すIC<sub>50</sub>値とを比較し、(アポトーシス誘導作用を示すED<sub>50</sub>値)を(COX阻害作用を示すIC<sub>50</sub>値)で除した値が大きければ大きいほど「COX阻害作用を有し、アポトーシス誘導作用の弱い化合物」である。該「COX阻害作用を有し、アポトーシス誘導作用の弱い化合物」として好ましくは、

COX阻害作用を示す $IC_{50}$ 値が約 $100\mu M$ 以下かつアポトーシス誘導作用を示す $ED_{50}$ 値が約 $100\mu M$ 以上である化合物であり、より好ましくは、COX阻害作用を示す $IC_{50}$ 値が約 $20\mu M$ 以下で、かつアポトーシス誘導作用を示す $ED_{50}$ 値が約 $100\mu M$ 以上である化合物である。また、上記のスクリーニング方法(A)に代えて、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物を選択した後、当該ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物の存在下にCOX阻害作用を検出することによっても、「COX阻害作用を有し、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物」を選択することができる。

【0023】また、上記のスクリーニング方法(A)において、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導作用を有する化合物と試験化合物とを共存させることにより、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物をスクリーニングすることができる。すなわち、本発明のスクリーニング方法(B)は、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導作用を有する化合物の存在下に、消化管粘膜細胞、特に胃粘膜細胞培養系を用いて、COX阻害作用を有する化合物の中からネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物を選択する方法である。ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を示す化合物とは、通常、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用に関する50%阻害濃度( $IC_{50}$ ) (誘導されたネクローシスおよび／またはアポトーシスを50%抑制するために必要な濃度)が約 $100\mu M$ 以下である化合物をいう。ここで用いられるネクローシス誘導作用を有する化合物としては、例えばインドメタシン、アスピリン、ジクロフェナック等が挙げられ、なかでもインドメタシン等が好ましく用いられる。また、アポトーシス誘導作用を有する化合物としては、インドメタシン、アスピリン、ジクロフェナック等が挙げられ、なかでもインドメタシン等が好ましく用いられる。以下にCOX阻害作用およびネクローシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法、COX阻害作用およびアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法について詳述する。

【0024】3. COX阻害作用およびネクローシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法  
膜の透過性変化を指標に、種々のNSAIDsが胃粘膜細胞においてネクローシスを誘導する条件を検討し、1時間NSAIDs処理で見られる細胞死がネクローシスであることが見出されている(Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281, G1092-G1100, 2001)。検査対象のNSAIDsの0.5~2時間(好ましくは1時間)処理における細胞死を、トリバンプルー染色法(Diq. Dis. Sci. 45, 1674-1679, 2000)、及びMTT法(Biol. Pharm. Bull. 24, 887-891, 2001)で調べることににより、ネクローシスを

検出することができる。この0.5~2時間(好ましくは1時間)NSAIDs処理胃粘膜細胞においてネクローシスを誘導する評価系に試験化合物を共存させることにより、試験化合物のネクローシス誘導阻害作用に関する50%阻害濃度( $IC_{50}$ ) (誘導されたネクローシスを50%抑制するために必要な濃度)を算出することができる。ネクローシス誘導阻害作用を示す化合物としては、好ましくはその $IC_{50}$ 値が約 $100\mu M$ 以下である化合物であり、より好ましくは、その $IC_{50}$ 値が約 $20\mu M$ 以下である化合物である。

【0025】4. COX阻害作用およびアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物のスクリーニング方法  
DNAの断片化、クロマチンの凝集、caspaseの活性化を指標に、種々のNSAIDsが胃粘膜細胞においてアポトーシスを誘導する条件を検討し、16時間NSAIDs処理で見られる細胞死がアポトーシスであることが見出されている(Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281, G1092-G1100, 2001)。検査対象のNSAIDsの8~48時間(好ましくは12~24時間、より好ましくは16時間)処理における細胞死を、トリバンプルー染色法(Diq. Dis. Sci. 45, 1674-1679, 2000)、及びMTT法(Biol. Pharm. Bull. 24, 887-891, 2001)で調べることににより、アポトーシスを検出することができる。この8~24時間(好ましくは12~24時間、より好ましくは16時間)NSAIDs処理胃粘膜細胞においてアポトーシスを誘導する評価系に試験化合物を共存させることにより、試験化合物のアポトーシス誘導阻害作用に関する50%阻害濃度( $IC_{50}$ ) (誘導されたアポトーシスを50%抑制するために必要な濃度)を算出することができる。アポトーシス誘導阻害作用を示す化合物としては、好ましくはその $IC_{50}$ 値が約 $100\mu M$ 以下である化合物であり、より好ましくは、その $IC_{50}$ 値が約 $20\mu M$ 以下である化合物である。また、上記のスクリーニング方法(B)に代えて、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物を選択した後、当該ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物の存在下にCOX阻害作用を検出することによっても、「COX阻害作用を有し、ネクローシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物」を選択することができる。

【0026】上記のスクリーニング方法で得られる化合物は、塩を形成していてもよく、かかる塩としては、例えば、薬学的に許容可能な塩等が用いられる。例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩等があげられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩、ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩等があげられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエ

タノールアミン、シクロヘキサシルアミン、ジシクロヘキサシルアミン、 $N,N'$ -ジベンジルエチレンジアミン等との塩等があげられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸等との塩があげられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、プロピオン酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸等との塩があげられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルチニン等との塩があげられ、酸性アミノ酸との好適な例としては、例えば

【0027】本発明のスクリーニング方法(A)で得られる(1)COX阻害作用を有し、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物、および本発明のスクリーニング方法(B)で得られる(2)COX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物は、消化管粘膜障害、特に胃粘膜障害の副作用のない優れたNSAIDsとして有用であり、ヒトおよび動物（例えば、マウス、ラット、モルモット、ネコ、イス、ヒツジ、ウマ、ウシ、サル等）において安全に用いることができる。本発明のスクリーニング方法(A)で得られるCOX阻害作用を有し、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物、および本発明のスクリーニング方法(B)で得られるCOX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物は、例えば、疼痛（例えば、癌性疼痛、炎症による急性痛、慢性炎症による痛み、術後痛（切開創の痛み、深部痛、内臓痛、術後慢性痛等）、筋肉痛（慢性痛疾患に伴う筋肉痛、肩こり等）、関節痛、歯痛、顎関節痛、頭痛（偏頭痛、緊張型頭痛、発熱に伴う頭痛、高血圧に伴う頭痛等）、内臓痛（心臓痛、狭心痛、腹痛、腎臓の痛み、尿管の痛み、膀胱の痛み等）、産婦人科領域の痛み（中間痛、月経困難、陣痛等）、神経痛（椎間板ヘルニア、神経根痛、帯状疱疹後神経痛、三叉神経痛等）等）、炎症性疾患（疼痛発熱、網膜炎、腎症、神経障害、大血管障害等の糖尿病性合併症、リウマチ、慢性関節リウマチ、変形性関節炎、リウマチ様脊髄炎、痛風性関節炎、骨膜炎等の関節炎、腰痛、痛風、手術・外傷後の炎症、腫脹の緩解、神経痛、咽頭炎、膀胱炎、慢性肝炎、急性脾炎、慢性脾炎、クローン病、潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患、髄膜炎、炎症性眼疾患、肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核等の炎症性肺疾患等）、アレルギー性疾患（喘息、アトピー性皮膚炎、慢性閉塞性肺疾患等）、中枢神経障害（脳出血および脳梗塞等の脳血管障害、頭部外傷、脊椎損傷、脳浮腫、多発性硬化症等）、神経変性疾患（アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、エイズ脳症等）、全身性エリセマトーデス、乾癬、膀胱ガン、乳ガン、子宮頸部ガン、慢性リンパ性白

血球、慢性骨髄性白血病、大腸ガン、結腸ガン、直腸ガン、ヘリコバクターピロリ感染症、ホジキン病、インスリン依存性糖尿病、悪性黒色腫、多発性骨髄腫、非ホジキン性リンパ腫、非小細胞肺癌、卵巣ガン、消化性潰瘍、前立腺ガン、不妊症、ペーチュット病、全身性真菌感染症、急性バクテリア髄膜炎、急性心筋梗塞、急性ウイルス脳炎、成人呼吸促進症候群、バクテリア肺炎、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘-帯状疱疹ウイルス感染症、AIDS、ヒトパピローマウイルス感染症、インフルエンザ、侵襲性ブドウ球菌感染症、敗血症、間質性肝疾患、時局性回腸炎、循環器系疾患（狭心症、心筋梗塞、うっ血性心不全、汎発性血管内凝固症候群、動脈硬化、末梢血管疾患等）等の予防・治療剤として有用である。

【0028】本発明のスクリーニング方法(A)で得られる(1)COX阻害作用を有し、ネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物、および本発明のスクリーニング方法(B)で得られる(2)COX阻害作用を有し、かつネクロシスおよび／またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物は、COX阻害活性による各種の疾患の予防、治療において、自体公知の方法により薬理的に許容される担体を混合した医薬組成物として安全に投与することができる。該投与量は、投与対象、投与ルート、疾患等によっても異なるが、例えば成人に対し、経口剤として投与する場合、約0.1ないし20 mg/kg体重、好ましくは約0.2ないし10 mg/kg体重、さらに好ましくは約0.5ないし10 mg/kg体重であって、1日1ないし数回に分けて投与することができる。

【0029】本発明の医薬組成物の製造に用いられてもよい薬理的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質があげられ、例えば、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤等があげられる。また、必要に応じて、通常の防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤等の添加物を用いることもできる。

【0030】賦形剤としては、例えば、乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、コーンスターチ、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸等が挙げられる。滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカ等が挙げられる。結合剤としては、例えば、結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、デンプン、ショ糖、ゼラチン、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等が挙げられる。崩壊剤としては、例えば、デンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウム、L-ヒドロキシプロピルセ

ルコース等が挙げられる。溶剤としては、例えば、注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油、オリーブ油等が挙げられる。溶解補助剤としては、例えば、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられる。

【0031】懸濁化剤としては、例えば、ステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン等の界面活性剤；例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース等の親水性高分子等が挙げられる。等張化剤としては、例えば、ブドウ糖、D-ソルビトール、塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトール等が挙げられる。緩衝剤としては、例えば、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、クエン酸塩等の緩衝液等が挙げられる。無痛化剤としては、例えば、ベンジルアルコール等が挙げられる。防腐剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸等が挙げられる。抗酸化剤としては、例えば、亜硫酸塩、アスコルビン酸、 $\alpha$ -トコフェロール等が挙げられる。

【0032】また、本発明の医薬組成物は、糖尿病治療剤、糖尿病性合併症治療剤、抗高脂血症剤、降圧剤、利尿剤、化学療法剤、免疫療法剤などの薬剤（以下、併用薬剤と略記する）と組み合わせて用いることができる。また、本発明の医薬組成物自体がこれら併用薬剤を含有することもできる。本明細書においては、特に断りがない限り、単に「併用」と表現する場合には、別々の薬剤で投与する形態および一つの薬剤として合剤にする形態のいずれであってもよい。別々の薬剤として組み合わせて使用する際、本発明の剤および併用薬剤の投与時期は限定されず、これらを投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。さらに、併用薬剤は、2種以上を適宜の割合で組み合わせて用いてもよい。併用薬剤の投与量は、各薬剤の临床上用いられている用量を基準として適宜選択することができる。また、本発明の剤と併用薬剤の配合比は、投与対象、投与ルート、対象疾患、症状、組み合わせなどにより適宜選択することができる。

#### 【0033】

【発明の実施の形態】以下に参考例、製造例、実験例および実施例を挙げて、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。以下の製造例中の「室温」は、通常、約10°Cから約35°Cを示

す。℃は特記しない限り重量パーセントを示す。シリカゲルは特記しない限り Kieselgel 60、0.063~0.200mm (Merck) を示し、塩基性シリカゲルと記載されている場合は Chromatorex NH-DM1020、0.100~0.200mm、(富士シリシア化学) を示す。以下の実験例に記載の遺伝子操作法は、マニアティス (Maniatis) ら、モレキュラー・クローニング (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989年) に記載されている方法もしくは試薬の添付プロトコールに記載されている方法に従った。その他の本文中で用いられている略号は下記の意味を示す。

s : シングレット (singlet)  
d : ダブルレット (doublet)  
t : トリプレット (triplet)  
q : クアルテット (quartet)  
m : マルチプレット (multiplet)  
br : ブロード (broad)  
J : カップリング定数 (coupling constant)  
Hz : ヘルツ (Hertz)  
CCl<sub>4</sub> : 重クロロホルム  
DMSO-d<sub>6</sub> : 重ジメチルスルホキシド  
NMR : プロトン核磁気共鳴

#### 【0034】

【実施例】製造例1 2-ヒドラジノビリジン  
ジャーナル・オブ・メディシナル・ケミストリー (J. Med. Chem.), 28巻、1394頁 (1985年) に記載の方法に準じて製造した。2-クロロビリジン (200 mL, 2.1 mol) およびヒドラジン-水和物 (400 mL, 8.2 mol) を20時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、過剰の抱水ヒドラジンを減圧下で濃縮留去して、残渣を水に注いだ。水酸化ナトリウム溶液を加えて塩基性にした後、有機物をクロロホルムで抽出した。抽出液を飽和食塩水および水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去して、表題化合物 (収量157 g, 収率68%) を得た。本品はこれ以上精製することなく次の工程に用いた。

#### 【0035】製造例2 3-メチル-1-(2-ビリジニル)-1H-ピラゾール-5-イルアミン

アミノクロトノニトリル (82 g, 1.0 mol) および2-ヒドラジノビリジン (120 g, 1.1 mol) のエタノール (300 mL) 氷冷溶液に、酢酸 (132 g, 2.2 mol) を加えて3.5時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、反応溶媒を減圧下で濃縮留去し、残渣に水を加えた。さらに水酸化ナトリウム水溶液を加えて塩基性にした後、有機物を酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水および水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル) で精製することにより、表題化合物 (収量156.3 g, 収率90%) を得た。

融点103-104°C (酢酸エチルから再結晶)。  
NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 2.25 (3H, s), 5.37 (1H, s), 5.92 (2

H, br s), 7.07 (1H, m), 7.76 (1H, m), 7.94 (1H, d, J = 7.0 Hz), 8.32 (1H, d, J = 6.0 Hz)。

【0036】製造例3 2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)安息香酸

テトラヘドロン・レターズ (Tetrahedron Lett.)、37巻、2767頁(1996年)に記載の方法に従って製造した。アルゴン雰囲気下、1-クロロ-4-(トリフルオロメチル)ベンゼン(25.8 g, 143 mmol)およびテトラメチルエチレンジアミン(16.6 g, 143 mmol)のテトラヒドロフラン(250 mL)溶液を-78°Cまで冷却し、そこに1.6モルブチルリチウムヘキサン(89.4 mL, 143 mmol)溶液を滴下し、同温で30分間攪拌した。反応液を砕いたドライアイスに注意深く注ぎ、室温まで昇温した。溶媒を減圧下で濃縮した後、残渣を水に注いだ。これをジエチルエーテルで洗浄した後、濃塩酸を加えて酸性にし、有機物をジクロロメタンで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を濃縮留去した。得られた残渣をヘキサンから結晶化して、表題化合物(収率20.6 g、収率64%)を得た。

NMR(CDC<sub>l</sub><sub>3</sub>) δ: 7.65 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.75 (1H, d, J = 2.2 Hz, 8.4 Hz), 8.31 (1H, d, J = 2.2 Hz), hidden(1H)。

【0037】製造例4 2-[[3-メチル-1-(2-ビリジニル)-1H-ピラゾール-5-イル]アミノ]-5-(トリフルオロメチル)安息香酸

アルゴン雰囲気下、3-メチル-1-(2-ビリジニル)-1H-ピラゾール-5-イルアミン(8.71 g, 50.0 mmol)、2-クロロ-5-(トリフルオロメチル)安息香酸(12.4 g, 55.0 mmol)、酢酸銅(II)(1.00 g, 5.50 mmol)および炭酸カリウム(7.60 g, 55.0 mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(50 mL)溶液を1.5時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、反応混合物を水に注いだ。酢酸溶液で弱酸性にした後、析出した粗結晶を濾取した。これを水で洗浄後風乾して、表題化合物(収量17.7 g、収率89%)を得た。

融点228-229°C(酢酸エチルから再結晶)。

NMR(CDC<sub>l</sub><sub>3</sub>) δ: 2.37 (3H, s), 6.19 (1H, s), 7.13 (1H, ddd, J = 1.0 Hz, 4.8 Hz, 7.4 Hz), 7.70-7.85 (3H, m), 7.93 (1H, d, J = 8.4 Hz), 8.39 (1H, d, J = 1.8 Hz), 8.45 (1H, ddd, J = 0.8 Hz, 1.8 Hz, 4.8 Hz), 12.46 (1H, br s), hidden(1H)。

元素分析値: C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>として

計算値: C, 56.36; H, 3.62; N, 15.46。

実測値: C, 56.56; H, 3.52; N, 15.63。

【0038】製造例5 4-クロロ-3-メチル-1-(2-ビリジニル)-6-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン

2-[[3-メチル-1-(2-ビリジニル)-1H-ピラゾール-5-イル]アミノ]-5-(トリフルオロメチル)安息香酸(14.0 g, 38.6 mmol)のオキシ塩化リン(27.4 mL, 294 mmol)溶液を1時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、反応溶

媒を減圧下で濃縮留去して、残渣を氷水に注いだ。水酸化ナトリウム溶液を加えて中和した後、有機物をクロロホルムで抽出した。抽出液を飽和食塩水および水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:クロロホルム=1:1~クロロホルム)で精製して、表題化合物(収量7.07 g、収率50%)を得た。

融点206°C(酢酸エチル/メタノールから再結晶)。

NMR(CDC<sub>l</sub><sub>3</sub>) δ: 3.01 (3H, s), 7.28 (1H, ddd, J = 1.0 Hz, 4.8 Hz, 7.4 Hz), 7.91-7.99 (2H, m), 8.27 (1H, d, J = 9.2 Hz), 8.68-8.77 (3H, m)。

元素分析値: C<sub>17</sub>H<sub>10</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>4</sub>として

計算値: C, 56.29; H, 2.78; N, 15.45; Cl, 9.77; F, 15.71。

実測値: C, 56.23; H, 3.00; N, 15.23; Cl, 9.62; F, 15.70。

【0039】製造例6 3-メチル-1-(2-ビリジニル)-6-(トリフルオロメチル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン(以下、化合物Aと略記する)

4-クロロ-3-メチル-1-(2-ビリジニル)-6-(トリフルオロメチル)-1H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン(6.50 g, 17.9 mmol)のエタノール(300 mL)溶液に、6規定塩酸(10 mL, 60 mmol)を加えて5時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、析出した結晶を濾取した。これをエタノールで洗浄後風乾し、得られた結晶をエタノールから再結晶して、表題化合物(収量4.69 g、収率76%)を得た。

融点250-251°C(エタノールから再結晶)。

NMR(CDC<sub>l</sub><sub>3</sub>) δ: 2.74 (3H, s), 7.26 (1H, ddd, J = 1.2 Hz, 5.0 Hz, 7.2 Hz), 7.53 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.84 (1H, dd, J = 2.0 Hz, 8.8 Hz), 7.92 (1H, ddd, J = 1.8 Hz, 7.2 Hz, 8.4 Hz), 8.03 (1H, ddd, J = 1.0 Hz, 1.2 Hz, 8.4 Hz), 8.49 (1H, ddd, J = 1.0 Hz, 1.8 Hz, 5.0 Hz), 8.75 (1H, d, J = 2.0 Hz), 11.65 (1H, br s)。

元素分析値: C<sub>17</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>Oとして

計算値: C, 59.31; H, 3.22; N, 16.27; F, 16.55。

実測値: C, 59.23; H, 3.40; N, 16.00; F, 16.59。

【0040】製造例7 1-(2-ビリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン(以下、化合物Bと略記する)

メタンスルホン酸(20 mL, 0.31 mol)に五酸化ニリン(5.00 g, 35.2 mmol)を加えて100°Cに加熱した。同温でこの反応混合物を良く攪拌しながら、2-[[1-(2-ビリジニル)-1H-ピラゾール-5-イル]アミノ]安息香酸(1.94 g, 6.92 mmol)の粉末を少量ずつ加えた。反応混合物を同温度下で10分間加熱攪拌した。反応液を室温まで冷却後、反応混合物に氷水を加えた。さらに水酸化ナトリウム水溶液を加えて塩基性にした後、有機物を酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水および水で洗浄した後、無水

硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（クロロホルム：メタノール = 99:1）で精製して、表題化合物（収量1.35 g、収率 74%）を得た。

融点240-242°C（エタノールから再結晶）。

NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.32-7.40 (1H, m), 7.42-7.49 (1H, m), 7.71-7.80 (1H, m), 7.96-8.01 (1H, m), 8.07-8.15 (2H, m), 8.24-8.29 (1H, m), 8.39 (1H, s), 8.64-8.68 (1H, m), 12.03 (1H, br s)。

元素分析値:  $C_{13}H_8N_4O$ として

計算値: C, 68.69; H, 3.84; N, 21.36。

実測値: C, 68.68; H, 3.89; N, 21.36。

【0041】製造例8 4-クロロ-5-フルオロ-3-メチル-1-(2-ビリジニル)-1H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン アルゴン雰囲気下、3-メチル-1-(2-ビリジニル)-1H-ピラゾール-5-イルアミン(5.23 g, 30 mmol)、2-フルオロ-6-ヨード安息香酸(9.57 g, 36 mmol)、酢酸銅(II)(0.654 g, 3.6 mmol)および炭酸カリウム(4.98 g, 36 mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(30mL)溶液を1時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、反応混合物を水に注いだ。酢酸溶液で弱酸性にした後、析出した粗結晶を濾取し、水で洗浄後風乾した。得られた粗結晶をオキシ塩化リン(20 mL, 0.21 mol)に溶解し、1時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、反応溶媒を減圧下で濃縮留去して、残渣を氷水に注いだ。水酸化ナトリウム溶液を加えて塩基性にした後、有機物をクロロホルムで抽出した。抽出液を飽和食塩水および水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して、表題化合物（収量4.78 g、収率51%）を得た。融点160-161°C（酢酸エチルから再結晶）。

NMR(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$ : 3.01 (3H, s), 7.14-7.29 (2H, m), 7.63-7.76 (1H, m), 7.88-8.01 (2H, m), 8.65-8.78 (2H, m)。

元素分析値:  $C_{16}H_8ClFN_4$ として

計算値: C, 61.45; H, 3.22; N, 17.92; Cl, 11.34; F, 6.08。

実測値: C, 61.19; H, 3.43; N, 17.94; Cl, 11.23; F, 6.05。

【0042】製造例9 5-フルオロ-3-メチル-1-(2-ビリジニル)-1,9-ジヒドロ-4H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン-4-オン 塩酸塩（以下、化合物Cと略記する）

4-クロロ-5-フルオロ-3-メチル-1-(2-ビリジニル)-1H-ピラゾロ[3,4-b]キノリン(4.78 g, 15 mmol)のエタノール(60 mL)溶液に、6規定塩酸(6.25 mL, 38 mmol)を加えて2時間加熱還流した。反応液を室温まで冷却後、反応溶媒を減圧下で濃縮留去した。残渣に水酸化ナトリウム水溶液を加えて塩基性にした後、有機物をクロロホルムで抽出した。抽出液を飽和食塩水および水で洗浄した後、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留

去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した後に塩酸塩に変換して、表題化合物（収量4.04 g、収率80%）を得た。

融点>380°C

NMR(DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 2.58 (3H, s), 6.42-6.54 (1H, m), 7.09-7.29 (3H, m), 7.84-7.95 (1H, m), 8.44 (1H, d,  $J$  = 1.2 Hz, 4.8 Hz), 8.95 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz), hidden (1H)。

元素分析値:  $C_{16}H_8FN_4O \cdot HCl$ として

10 計算値: C, 58.10; H, 3.66; N, 16.94; F, 5.74。

実測値: C, 58.44; H, 3.32; N, 16.83; F, 5.75。

【0043】参考例1 ヒトCOX-1cDNA組換えバキュロウイルスの調製

PCR法で取得したヒトCOX-1cDNA (FASEB J., 5 (9), 2304-2312 (1991))を含む1.8 kbのDNA断片をプラスミドpFASTBAC1 (CIBCOBRL)に挿入し、プラスミドpFBCOX1を作製した。プラスミドpFBCOX1とBAC-10-BAC Baculovirus Expression System (CIBCOBRL)を用いて組換えバキュロウイルスのウイルスストックBAC-COX1を調製した。

20 【0044】参考例2 COX-1発現昆虫細胞からのミクロソーム画分の調製

Sf-21細胞を $1 \times 10^6$  cells/mlとなるように125 mL Sf-900 II SFM培地(GIBCO-BRL)に播種した後、27°Cで24時間培養した。組換えバキュロウイルスのウイルスストックBAC-COX1を0.75 mL添加した後、さらに72時間培養した。培養液から遠心分離(3000 rpm, 10分間)により、細胞を分離した後、PBSで細胞を2回洗浄した。細胞を10 mL Lysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA)に懸濁した後、ホモジナイザー (POLYTRON)で2000 rpm, 20秒間処理を3回行うことで細胞を破砕した。遠心分離(2000 rpm, 10分間)して得られた上清を遠心分離(40000 rpm, 45分間)して得た沈殿をLysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 5mM EDTA)に再懸濁して、-80°Cで保存した。

【0045】参考例3 ヒトCOX-2cDNA組換えバキュロウイルスの調製

PCR法で取得したヒトCOX-2cDNA (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 89 (16), 7384-7388 (1992))を含む1.8 kbのDNA断片をプラスミドpFASTBAC1 (CIBCOBRL)に挿入し、プラスミドpFBCOX2を作製した。プラスミドpFBCOX2とBAC-10-BAC Baculovirus Expression System (CIBCOBRL)を用いて組換えバキュロウイルスのウイルスストックBAC-COX2を調製した。

【0046】参考例4 COX-2発現昆虫細胞からのミクロソーム画分の調製

Sf-21細胞を $1 \times 10^6$  cells/mlとなるように125 mL Sf-900 II SFM培地(GIBCOBRL)に播種した後、27°Cで24時間培養した。組換えバキュロウイルスのウイルスストックBAC-COX2を0.75 mL添加した後、さらに72時間培養した。培養液から遠心分離(3000 rpm, 10分間)により、

細胞を分離した後、PBSで細胞を2回洗浄した。細胞を10 ml Lysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 5mM EDTA) に懸濁した後、ホモジナイザー (POLYTRON) で2000 rpm, 20秒間処理を3回行うことで細胞を破碎した。遠心分離 (2000 rpm, 10分間) して得られた上清を遠心分離 (40000 rpm, 45分間) して得た沈殿をLysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 5mM EDTA) に再懸濁して、-80°Cで保存した。

【0047】試験例1 COX-1, COX-2阻害活性の測定  
10倍濃度の反応バッファー (1M Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA, 1.0 % Tween20, 50 mM ルミノール, 100 μM hematin) 20 μlとミクロソーム画分 (COX-1: 40 μM

\* q, COX-2: 20 μM) 20 μlと 蒸留水55 μlを混合後、DMFに溶解した供試化合物を5 μl添加し、37°Cで25分間静置した。アラキドン酸 (20 μM) を100 μl添加する事により反応を開始させ、アラキドン酸添加直後から10秒間の化学発光量をルミスター (Lumistar (BMG Labtechnologies GmbH)) を用いて計測した。阻害率はDMF 5 μl添加時の酵素活性を100%、flurbiprofen (4 mM) 5 μl添加時の酵素活性を0%として計算した。酵素活性を50%阻害するのに必要な供試化合物の濃度(IC<sub>50</sub>値)をPRISM2.01(グラフパッド ソフトウェア社)にて算出した。結果を表1に示す。

【表1】

検体	COX-1阻害活性 (IC <sub>50</sub> 値)	COX-2阻害活性 (IC <sub>50</sub> 値)
化合物A	0.45 μM	0.38 μM
化合物B	2.66 μM	1.37 μM
化合物C	7.80 μM	3.70 μM

表1の結果から、化合物A,BおよびCは、優れたCOX阻害作用を有することが分かる。

【0048】実施例1 ネクロシス検出方法  
試験化合物をモルモット胃粘膜初代培養細胞と、1時間処理 (Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281, G1092-G1100, 2001) したのち、細胞の生存率を、トリパンブルー染色法 (Diq. Dis. Sci. 45, 1674-1679, 2000)、あるいはMIT法 (Biol. Pharm. Bull. 24, 887-891, 2001) で調べることで、ネクロシスを検出することができる。また、ネクロシスが起きていることの確認は以下の方法で核膜の損傷を調べることも行うことができる。

(核膜損傷のアッセイ) 細胞を 0.17 mM Hoechst 33342 と100 μg/ml propidium iodideで20分インキュベートした後、蛍光顕微鏡で観察する。ネクロシスを起こす※

※した細胞は、propidium iodide を排出できないため、ピンク色に核が染まる。上記の方法によりネクロシスを検出することにより試験化合物のED<sub>50</sub>を算出し、該化合物のCOX阻害作用についてのIC<sub>50</sub>と比較することにより「COX阻害作用を有し、ネクロシス誘導作用の弱い化合物」を得ることができる。

【0049】実施例2 アポトーシス検出方法  
化合物Bまたは化合物Cをモルモット胃粘膜初代培養細胞と、16時間処理 (Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 281, G1092-G1100, 2001) したのち、MIT法 (Biol. Pharm. Bull. 24, 887-891, 2001) で細胞生存率を測定することにより、アポトーシスを検出した。結果を表2に示す。

【表2】

化合物濃度	生存率 (%)	
	平均値 (n = 3) ± 標準誤差	
	化合物B	化合物C
0 mM	100 ± 3.5	100 ± 3.1
0.1 mM	-	102 ± 2.4
0.2 mM	100 ± 3.9	100 ± 5.1
0.3 mM	102 ± 1.9	106 ± 1.3
0.4 mM	100 ± 0.4	100 ± 0.6
0.5 mM	96 ± 4.9	99 ± 2.4
0.6 mM	99 ± 4.7	-
0.7 mM	99 ± 2.9	-

また、アポトーシスが起きていることの確認は以下の方法でDNA断片化を検出することによっても行うことができる。

(DNA断片化) 細胞を70 μlのlysis buffer (50 mM Tris 50

-HCl (pH7.8), 10 mM EDTA, 0.5% sodium-N-lauroylsarcosinate) で懸濁後、Proteinase Kを最終濃度1 mg/mlで50°C、2時間インキュベートする。次にRNaseAを最終濃度0.5 mg/mlで50°C、30分インキュベートする。サ



ンブルは2% agarose gel electrophoresis で解析する。上記の方法によりアポトーシスを検出することにより試験化合物のED<sub>50</sub>を算出し、該化合物のCOX阻害作用についてのIC<sub>50</sub>と比較することにより「COX阻害作用を有し、アポトーシス誘導作用の弱い化合物」を得ることができる。

#### 【0050】実施例3 化合物Aのコート錠の製造

(1) 化合物A	10.0 q
(2) 乳糖	60.0 q
(3) コーンスターチ	35.0 q
(4) ゼラチン	3.0 q
(5) ステアリン酸マグネシウム	2.0 q

化合物A 10.0 qと乳糖60.0 qおよびコーンスターチ35.0 qの混合物を10重量%ゼラチン水溶液30 ml（ゼラチンとして3.0 q）を用い、1 mmメッシュの篩を通して顆粒化し、40℃で乾燥し、再び篩過する。得られる顆粒をステアリン酸マグネシウム2.0 qと混合し、圧縮する。得られる中心錠を、蔗糖、二酸化チタン、タルクおよびアラビアゴムの水懸濁液による糖衣でコーティングする。コーティングが施された錠剤をミツロウで艶出して1000錠

#### 【0051】実施例4 化合物Aの錠剤の製造

(1) 化合物A	10.0 q
(2) 乳糖	70.0 q
(3) コーンスターチ	50.0 q
(4) 可溶性デンプン	7.0 q
(5) ステアリン酸マグネシウム	3.0 q

化合物A 10.0 qとステアリン酸マグネシウム3.0 qを可溶性デンプンの水溶液70 ml（可溶性デンプンとして7.0 q）で顆粒化し、乾燥し、乳糖70.0 qおよびコーンスターチ50.0 qと混合する。混合物を圧縮して1000錠の錠剤を得る。

#### 【0052】実施例5 化合物Bのコート錠の製造

(1) 化合物B	10.0 q
(2) 乳糖	60.0 q
(3) コーンスターチ	35.0 q

10

#### \* (4) ゼラチン

3.0 q

#### (5) ステアリン酸マグネシウム

2.0 q

化合物B 10.0 qと乳糖60.0 qおよびコーンスターチ35.0 qの混合物を10重量%ゼラチン水溶液30 ml（ゼラチンとして3.0 q）を用い、1 mmメッシュの篩を通して顆粒化し、40℃で乾燥し、再び篩過する。得られる顆粒をステアリン酸マグネシウム2.0 qと混合し、圧縮する。得られる中心錠を、蔗糖、二酸化チタン、タルクおよびアラビアゴムの水懸濁液による糖衣でコーティングする。コーティングが施された錠剤をミツロウで艶出して1000錠の錠剤を得る。

#### 【0053】実施例6 化合物Bの錠剤の製造

(1) 化合物B	10.0 q
(2) 乳糖	70.0 q
(3) コーンスターチ	50.0 q
(4) 可溶性デンプン	7.0 q
(5) ステアリン酸マグネシウム	3.0 q

化合物B 10.0 qとステアリン酸マグネシウム3.0 qを可溶性デンプンの水溶液70 ml（可溶性デンプンとして7.0 q）で顆粒化し、乾燥し、乳糖70.0 qおよびコーンスターチ50.0 qと混合する。混合物を圧縮して1000錠の錠剤を得る。

#### 【0054】

【発明の効果】本発明のスクリーニング方法により、(1)COX阻害作用を有し、ネクローシスおよび/またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物、および(2)COX阻害作用を有し、かつネクローシスおよび/またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物を効率良く得ることができる。本発明のスクリーニング方法で得られる(1)COX阻害作用を有し、ネクローシスおよび/またはアポトーシス誘導作用の弱い化合物、および(2)COX阻害作用を有し、かつネクローシスおよび/またはアポトーシス誘導阻害作用を有する化合物は、消化管粘膜障害、特に胃粘膜障害のない非ステロイド性抗炎症剤等として有用である。

\*

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F 1

テーマコード(参考)

A 61 P 43/00

111

A 61 P 43/00

111

G 01 N 33/15

G 01 N 33/15

Z

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-207507

(43)Date of publication of application : 25.07.2003

(51)Int.Cl.

G01N 33/50  
A61K 45/00  
A61P 25/04  
A61P 29/00  
A61P 43/00  
G01N 33/15

(21)Application number : 2002-313275

(71)Applicant : TAKEDA CHEM IND LTD

(22)Date of filing : 28.10.2002

(72)Inventor : MIZUSHIMA TORU  
NARUO KENICHI

(30)Priority

Priority number : 2001330835

Priority date : 29.10.2001

Priority country : JP

## (54) SCREENING METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a screening method of a compound having COX inhibiting action and being free from affection and adverse reaction on gastrointestinal membrane.

SOLUTION: This screening method (1) of the compound having COX inhibiting action and having weak necrosis and/or apoptosis inducing action, characterized by cultivating gastrointestinal membrane cell in the presence of the compound having the COX inhibiting action, and detecting the necrosis and/or apoptosis inducing action. This screening method (2) of the compound having COX inhibiting action and having weak necrosis and/or apoptosis inducing action, characterized by cultivating the gastrointestinal membrane cell and detecting the necrosis and/or apoptosis inducing activity in the presence of the compound having COX inhibiting action, and a necrosis inducing agent or an apoptosis inducing agent. A compound or its salt is prepared by applying the screening method of (1) or (2).

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

decision of rejection]

[Date of extinction of right]

\* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] It has the COX inhibitory action characterized by cultivating an alimentary canal mucosal cell and detecting necrosis and/or apoptosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action, and is the screening approach of the weak compound necrosis and/or an apoptosis induction operation.

[Claim 2] The screening approach of a nonsteroidal anti-inflammatory compound with few alimentary canal failures characterized by cultivating an alimentary canal mucosal cell and detecting necrosis and/or apoptosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action.

[Claim 3] The screening approach according to claim 1 or 2 that an alimentary canal mucosal cell is a gastric-mucosa cell.

[Claim 4] The screening approach according to claim 1 or 2 that COX inhibitory action is COX-2 alternative inhibitory action.

[Claim 5] It has the COX inhibitory action obtained by the screening approach claim 1 thru/or given in four, and they are necrosis and/or the weak compound of an apoptosis induction operation, or its salt.

[Claim 6] The COX inhibitor which comes to contain a compound or its salt according to claim 5.

[Claim 7] \*\* according to claim 6 which is a pain or prevention / therapy agent of an inflammatory disease.

[Claim 8] The screening approach of a compound characterized by cultivating an alimentary canal mucosal cell and detecting necrosis or apoptosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action and a necrosis inducer, or an apoptosis inducer of having COX inhibitory action and having necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action.

[Claim 9] The screening approach according to claim 8 that an alimentary canal mucosal cell is a gastric-mucosa cell.

[Claim 10] The screening approach according to claim 8 that COX inhibitory action is COX-2 alternative inhibitory action.

[Claim 11] The compound which has the COX inhibitory action obtained by the screening approach claim 8 thru/or given in ten, and has necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action, or its salt.

[Claim 12] The physic constituent which comes to contain a compound or its salt according to claim 11.

[Claim 13] The physic constituent according to claim 12 which are necrosis and/or an apoptosis induction inhibitor.

[Claim 14] The physic constituent according to claim 12 which is a pain or prevention / therapy agent of an inflammatory disease.

[Claim 15] It has the COX inhibitory action characterized by cultivating a gastric-mucosa cell for 0.5 to 2 hours, and detecting necrosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action, and is the screening approach of the weak compound a necrosis induction operation.

[Claim 16] It has the COX inhibitory action characterized by cultivating a gastric-mucosa cell for 8 to 48 hours, and detecting apoptosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action, and is the screening approach of the weak compound an apoptosis induction operation.

[Claim 17] The screening approach of a compound that IC50 value which is characterized by cultivating a gastric-mucosa cell and detecting necrosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action and which shows COX inhibitory action is below about 100microM, and the ED50 value which shows a necrosis induction operation is more than about 100microM.

[Claim 18] The screening approach of a compound that IC50 value which is characterized by cultivating a gastric-mucosa cell and detecting apoptosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action and which shows COX inhibitory action is below about 100microM, and the ED50 value which shows an apoptosis induction operation is more than about 100microM.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the screening approach of the compound which has cyclooxygenase (COX) inhibitory action, and has the necrosis in alimentary canal membrane, especially a gastric-mucosa cell and/or the weak compound (nonsteroidal anti-inflammatory compound with few alimentary canal failures) of an apoptosis induction operation or the screening approach of the salt, and COX inhibitory action, and has the necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action of alimentary canal membrane, especially a gastric-mucosa cell, or its salt etc.

[0002]

[Description of the Prior Art] In current, use of a non steroid anti-inflammatory agent (NSAIDs) is cited as a cause of the main gastric ulcers and gastritis. However, it is expected that the patients who need NSAIDs with progress of an aging society on the other hand continue to increase in number [ continue ]. Therefore, the molecule device of the gastric-mucosa failure by NSAIDs is solved, and it is thought very important to develop NSAIDs without a gastric-mucosa failure side effect. It has so far been supposed that it is the gastric-mucosa failure by NSAIDs the cause for NSAIDs to check COX and to decrease the prostaglandin which is a gastric-mucosa defense factor. Moreover, from inflammation, COX-2 were mainly discovered, in gastric mucosa, since COX-1 was mainly discovered, it was thought that COX-2 alternative NSAIDs turned into NSAIDs without a gastric-mucosa failure, and COX-2 alternative NSAIDs was put on the market successively recently. Compared with NSAIDs which surely does not have selectivity, there are few gastric-mucosa failures of COX-2 alternative NSAIDs, and this idea (the so-called COX theory) is partially considered to be the right. However, in addition to COX inhibition, it is thought in (1) living body from \*\* as which (3) COX-2 selectivity when the concentration which checks COX, and the concentration which causes a gastric-mucosa failure have deviation, and as which a gastric-mucosa failure is regarded also by (2) COX-2 alternative NSAIDs, and functionality perfect between gastric-mucosa failures are not regarded that the molecule device of the gastric-mucosa failure by the other NSAIDs exists.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention aims at development of a COX inhibitor without an alimentary canal membrane failure side effect.

[0004]

[Means for Solving the Problem] The indirect action by the COX inhibition in the gastric-mucosa failure according [ this invention persons ] to NSAIDs, In order to investigate positioning of the direct action by necrosis apoptosis induction, as a result of examining many things, the necrosis apoptosis by (1) NSAIDs not being influenced even if it adds a prostaglandin (the cause of necrosis and apoptosis not being COX inhibition --) Namely, it is shown that a direct action and an indirect action become independent. (2) In in vitro, necrosis and apoptosis happen also by COX-2 alternative NSAIDs, and the concentration does not have NSAIDs without selectivity, and great difference, (3) Although a big difference is looked at by extent of the gastric-mucosa failure in in vivo also by NSAIDs without selectivity Functionality is between the gastric-mucosa failure (in vivo) and the necrosis apoptosis induction potency of NSAIDs in in vitro, From the above point,

the gastric-mucosa failure by NSAIDs As a result of repeating research for both indirect action which considers the prostaglandin fall by COX-1 inhibition as a cause, and direct action (gastric-mucosa cell direct failure) by necrosis and apoptosis induction involving further based on headers and these knowledge, it came to complete this invention. Namely, this invention has the COX inhibitory action characterized by cultivating an alimentary canal mucosal cell and detecting necrosis and/or apoptosis induction activity under existence of the compound which has [1] COX inhibitory action, and is the screening approach (the screening approach of this invention (A)) of the weak compound necrosis and/or an apoptosis induction operation.;

[2] The screening approach of a nonsteroidal anti-inflammatory compound with few alimentary canal failures characterized by cultivating an alimentary canal mucosal cell and detecting necrosis and/or apoptosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action;

[3] The screening approach the above [1] whose alimentary canal mucosal cell is a gastric-mucosa cell, or given in [2];

[4] The screening approach the above [1] whose COX inhibitory action is COX-2 alternative inhibitory action, or given in [2];

[5] It has the COX inhibitory action obtained by the screening approach the above [1] thru/or given in [4], and they are necrosis and/or the weak compound of an apoptosis induction operation, or its salt;

[6] COX inhibitor which comes to contain the compound of the aforementioned [5] publication, or its salt;

[7] \*\* of the aforementioned [6] publication which is a pain or prevention / therapy agent of an inflammatory disease;

[8] The screening approach of a compound characterized by cultivating an alimentary canal mucosal cell and detecting necrosis or apoptosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action and a necrosis inducer, or an apoptosis inducer of having COX inhibitory action and having necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action (the screening approach of this invention (B));

[9] The screening approach of the aforementioned [8] publication that an alimentary canal mucosal cell is a gastric-mucosa cell;

[10] The screening approach of the aforementioned [8] publication that COX inhibitory action is COX-2 alternative inhibitory action;

[11] The compound which has the COX inhibitory action obtained by the screening approach the above [8] thru/or given in [10], and has necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action, or its salt;

[12] Physic constituent which comes to contain the compound of the aforementioned [11] publication, or its salt;

[13] Physic constituent of the aforementioned [12] publication which are necrosis and/or an apoptosis induction inhibitor;

[14] Physic constituent of the aforementioned [12] publication which is a pain or prevention / therapy agent of an inflammatory disease;

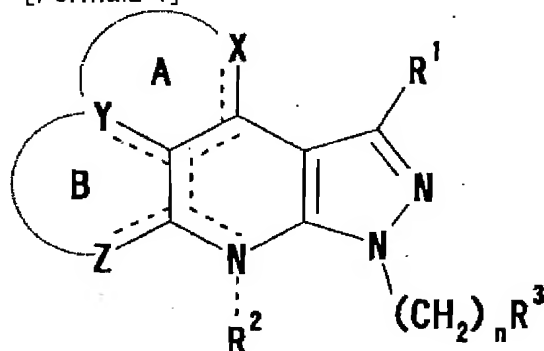
[15] It has the COX inhibitory action characterized by cultivating a gastric-mucosa cell for 0.5 to 2 hours, and detecting necrosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action, and is the screening approach of the weak compound a necrosis induction operation.;

[16] It has the COX inhibitory action characterized by cultivating a gastric-mucosa cell for 8 to 48 hours, and detecting apoptosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action, and is the screening approach of the weak compound an apoptosis induction operation.;

[17] The screening approach of a compound that IC50 value which is characterized by cultivating a gastric-mucosa cell and detecting necrosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action and which shows COX inhibitory action is below about 100microM, and the ED50 value which shows a necrosis induction operation is more than about 100microM;

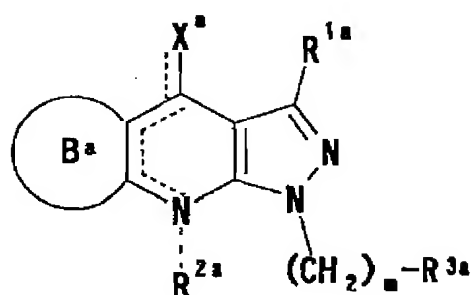
[18] Offer the screening approach of a compound that IC50 value which is characterized by cultivating a gastric-mucosa cell and detecting apoptosis induction activity under existence of the compound which has COX inhibitory action and which shows COX inhibitory action is below about 100microM, and the ED50 value which shows an apoptosis induction operation is more than about 100microM etc.

[0005] As "a compound which has COX inhibitory action" in this invention, as long as it has COX inhibitory action, any compounds can be used. As a compound, a synthetic compound, a fermentation product, a gene product (a peptide or protein), etc. may be any. COX-1 and COX-2 are mentioned as COX. The compound whose 50% inhibition concentration (IC50) (concentration required in order to control a COX operation 50%) concerning a COX operation with "it has COX inhibitory action" is below about 100microM is usually said. Specifically as "a compound which has COX inhibitory action" For example, dichlofenac, indomethacin, aspirin, ibuprofen, Classic NSAIDs(es), such as ketoprofen and piroxicam, SEREKOKISHIBU, ROFEKOKISHIBU, MK-663, BAL DEKOKISHIBU, SC-57666, JTE-522, S-2474, COX-2 selective inhibitor of SC-57666 grade, ML-3000 and p54 (COX inhibitor & 5-lipoxygenase inhibitor) etc. -- a formula (I) the dual inhibitor and nitrogen-monoxide isolation mold NSAIDs and given in WO 01/No. 72749 official report -- [Formula 1]

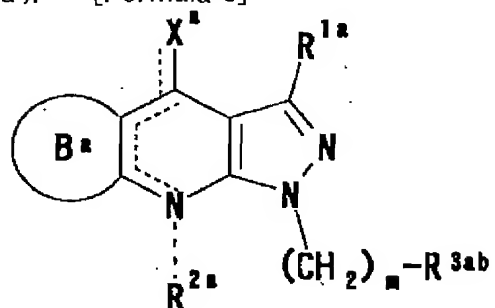


The amino group which may have the hydrogen atom, the hydrocarbon group in which you may have the substituent, and the substituent the inside of [type, and R1, The sulfur atom which may have the substituent, or the carboxyl group which may be esterified or amidated, The hydrocarbon group in which R2 may have no permuting, the hydrogen atom, or the substituent, the heterocycle radical on which R3 may have the substituent, and X, Y and Z The hydrocarbon group which may have hydrogen, a halogen, nitril, and a substituent respectively, The carboxyl group which may be esterified or amidated, the acyl group which may have the substituent, - NR four R5, an oxygen atom, -OR4, a sulfur atom, or -SR4 (R4 and R5) X and Y become together. Or it may form the annular amino group or a heterocycle radical with the nitrogen atom which the heterocycle radical or both which may have the hydrogen atom, the hydrocarbon group which may have the substituent, and the substituent become together respectively, and they combine, A ring The amount of [ which is shown with the continuous line with which Y and Z may become together and may form B ring, and a broken line ] bond part Either [ or ] single bond or a double bond. The allotropy or heterocycle of 5 in which the amount of [ which is shown with a broken line ] bond part may have [ either single bond or no permuting and A ring ] the substituent thru/or 7 members, The allotropy of 5 in which B ring may have the substituent thru/or 7 members or heterocycle, the compound by which n is expressed with] which shows the integer of 0 or 1, or its salt (it may be hereafter written as a compound (I)) is mentioned. [0006] the inside of a compound (I) -- formula (Ia): -- [Formula 2]





The hydrocarbon group in which R1a may have the hydrogen atom and the substituent among [type, or the carboxyl group which may be esterified or amidated, The hydrocarbon group in which R2a may have no permuting, the hydrogen atom, or the substituent, The heterocycle radical on which R3a may have the substituent, and Xa Hydrogen, a halogen, Nitril, the hydrocarbon group which may have the substituent, the carboxyl group which may be esterified or amidated, The acyl group and -NR4aR5a which may have the substituent, an oxygen atom, -OR4a, a sulfur atom, or -SR4a (R4a and R5a) The hydrocarbon group or both which may have the hydrogen atom and the substituent may become together respectively, and the annular amino group or a heterocycle radical may be formed with the nitrogen atom which they combine. The amount of [ which shows a part for the bond part shown with a continuous line and a broken line with either single bond or a double bond and a broken line ] bond part Single bond or either of no permuting, the allotropy of 5 in which Ba ring may have the substituent thru/or 7 members or heterocycle, the compound by which m is expressed with] which shows the integer of 0 or 1, or its salt (it may be hereafter written as a compound (Ia)) -- desirable -- especially -- formula (Ia'): -- [Formula 3]



The hydrocarbon group in which R1a may have the hydrogen atom and the substituent among [type, or the carboxyl group which may be esterified or amidated, The hydrocarbon group in which R2a may have no permuting, the hydrogen atom, or the substituent, The partial saturation monocycle type heterocycle radical which contains one nitrogen atom and one sulfur atom as the partial saturation heterocycle radical which contains two or less nitrogen atoms as a hetero atom or hetero atom with which R3ab may have the substituent, The hydrocarbon group in which Xa may have hydrogen, a halogen, nitril, and a substituent, The carboxyl group which may be esterified or amidated, the acyl group which may have the substituent, - NR4aR5a, an oxygen atom, -OR4a, a sulfur atom, or -SR4a (R4a and R5a) The hydrocarbon group or both which may have the hydrogen atom and the substituent may become together respectively, and the annular amino group or a heterocycle radical may be formed with the nitrogen atom which they combine. The amount of [ which shows a part for the bond part shown with a continuous line and a broken line with either single bond or a double bond and a broken line ] bond part Single bond or either of no permuting, The compound expressed with] which shows the integer of 0 or 1, or its salt (it may be hereafter written as a compound (Ia')) of the allotropy of 5 in which Ba ring may have the substituent thru/or 7 members or heterocycle, and m is desirable.

[0007] Hereafter, a compound (I) is explained in full detail. As a "hydrocarbon group" of the vocabulary "the hydrocarbon group which may have the substituent" used in this specification, for example, an aliphatic hydrocarbon radical, a monocycle type saturated hydrocarbon radical,

an aromatic hydrocarbon radical, etc. are raised, and a carbon number 1 thru/or 16 things are desirable. Specifically, an alkyl group, an alkenyl radical, an alkynyl group, a cycloalkyl radical, an aryl group, etc. are used. The low-grade alkyl group of an "alkyl group" etc. is desirable, for example, C1-6 alkyl groups, such as methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, and hexyl, etc. are used widely. A "alkenyl radical" has for example, a desirable low-grade alkenyl radical etc., for example, C2-6 alkenyl radicals, such as vinyl, 1-propenyl, an allyl compound, isopropenyl, butenyl, and iso butenyl, etc. are used widely. The low-grade alkynyl group of an "alkynyl group" etc. is desirable, for example, C2-6 alkynyl groups, such as ethynyl, propargyl, and 1-propynyl, etc. are used widely. A "cycloalkyl radical" has for example, a desirable low-grade cycloalkyl radical etc., for example, C3-6 cycloalkyl radicals, such as cyclo propyl, cyclo butyl, cyclopentyl, and cyclohexyl, etc. are used widely. C6-14 aryl groups of an "aryl group", such as phenyl, 1-naphthyl, 2-naphthyl, biphenyl, 2-indenyl, and 2-anthryl, etc. are desirable, for example, a phenyl group etc. is used widely.

[0008] As a substituent which the "hydrocarbon group" of "the hydrocarbon group which may have the substituent" may have For example, a halogen atom (for example, a fluorine, chlorine, a bromine, iodine, etc.), A nitro group, a cyano group, hydroxyl, the low-grade alkyl group that may be halogenated for example, methyl, chloro methyl, difluoromethyl, and TORIKURORO methyl -- Trifluoromethyl, ethyl, 2-BUROMO ethyl, 2 and 2, 2-trifluoroethyl, Pentafluoro ethyl, propyl, 3 and 3, 3-trifluoro propyl, Isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, 4, 4, and 4-trifluoro butyl, pentyl, isopentyl, neopentyl, The C1-6 alkyl group by which 5, 5, and 5-trifluoro pentyl, hexyl, 6 and 6, 6-trifluoro hexyl, etc. may be halogenated, a lower alkoxy group (for example, methoxy and ethoxy \*\* propoxy and isopropoxy --) Cyclo propoxy, butoxy one, iso butoxy, cyclo butoxy, pentyloxy, C1-6 alkoxy groups, such as cyclopentyloxy, hexyloxy one, and cyclohexyloxy etc., The amino group, a Monod low-grade alkylamino radical (for example, Monod C1-6 alkylamino radicals, such as methylamino and ethylamino etc.), A G low-grade alkylamino radical (for example, G C1-6 alkylamino radicals, such as dimethylamino and diethylamino etc.), A carboxyl group, a low-grade alkyl carbonyl group (for example, C1-6 alkyl carbonyl groups, such as acetyl and a propionyl etc.), a low-grade alkoxy carbonyl group (for example, methoxycarbonyl and ethoxycarbonyl --) C1-6 alkoxy carbonyl groups, such as propoxy carbonyl and butoxycarbonyl etc., a carbamoyl group and a Monod low-grade alkyl carbamoyl group (for example, methyl carbamoyl --) Monod C1-6 alkyl carbamoyl groups, such as ethyl carbamoyl etc., a G low-grade alkyl carbamoyl group (for example, dimethyl carbamoyl --) G C1-6 alkyl carbamoyl groups, such as diethylcarbamoyl etc., An aryl carbamoyl group (for example, C6-10 aryl carbamoyl groups, such as phenylcarbamoyl and naphthyl carbamoyl etc.), An aryl group (for example, C6-10 aryl groups, such as phenyl and naphthyl etc.), An aryloxy group (for example, C6-10 aryloxy groups, such as phenyloxy and naphthyloxy one etc.), The low-grade alkyl carbonylamino radicals (for example, C1-6 alkyl-carbonylamino radical by which acetylamino, trifluoroacetylamino, etc. may be halogenated) which may be halogenated are used. the "hydrocarbon group" of \*\* "the hydrocarbon group which may have the substituent" -- the aforementioned substituent -- the replaceable location of a hydrocarbon group -- 1 -- or 1 thru/or when you may have three pieces and the number of substituents is two or more pieces, each five substituents are preferably the same -- or you may differ.

[0009] As a "heterocycle radical" of the vocabulary "the heterocycle radical which may have the substituent" used in this specification for example, one sort chosen from the nitrogen atom, the oxygen atom, and the sulfur atom in addition to the carbon atom or 5 containing two sorts of 1 thru/or four hetero atoms (preferably 1 thru/or three pieces) thru/or 14 members (preferably 5 thru/or 10 members) (a monocycle type thru/or 3 ring type --) A monocycle type or 2 ring type heterocycle radical is raised preferably. For example, 2- or 3-thienyl, 3-furil, 1-, 2-, or 3-pyrrolyl, 1-, 2- or 3-pyrrolidinyl, 2-, 4-, or 5-oxazolyl, 3-, 4-, or 5-iso oxazolyl, 2-, 4-, or 5-thiazolyl, 3-, 4-, or 5-iso thiazolyl, 3-, 4-, or 5-pyrazolyl, 2-, 3- or 4-PIRAZORIJINIRU, 2-, 4-, or 5-imidazolyl, In addition to carbon atoms, such as 1, 2, 3-thoria ZORIRU, 1 and 2, 4-thoria ZORIRU, 1H-, or 2H-tetra-ZORIRU, an oxygen atom, The hetero atom chosen from the sulfur atom and the nitrogen atom 1 thru/or 5 membered-ring radical included four pieces, For example, 2-, 3- or 4-pyridinyl N-oxide-2-, 3-, or 4-pyridinyl 2-, 4- or 5-pyrimidinyl, N-oxide-2-,

4-, or 5-pyrimidinyl, Thio mol HORINIRU, mol HORINIRU, piperidino, 2-, 3-, or 4-piperidyl, Thio pyranlyl, 1,4-oxazinyl, 1,4-thiazinyl, 1,3-thiazinyl, Piperazinyl one, thoriadinyl, 3- or 4-pilus DAJINIRU, pyrazinyl, In addition to carbon atoms, such as N-oxide-3- or 4-pilus DAJINIRU, an oxygen atom, The hetero atom chosen from the sulfur atom and the nitrogen atom 1 thru/or 6 membered-ring radical included four pieces, For example, the indolyl, a benzofuril, bends oxazolyl, benzimidazolyl, Kino RINIRU, iso kino RINIRU, phthalazinyl, chinae-cortex ZORINIRU, kino KISARINIRU, In DORIJINIRU, kino RIJINIRU, 1, 8-naphthyridinyl, dibenzofuranyl, Carbazolyl, acridinyl, phenanthrolizinyl, chromanyl, phenothiazinyl, They are 1 thru/or bicyclic [ which is included four pieces ], or a tricyclic condensed-ring radical (preferably) about the hetero atom chosen from the oxygen atom, the sulfur atom, and the nitrogen atom in addition to carbon atoms, such as phenoxazinyl. The radical in which the 5 or 6 aforementioned membered-rings are formed by condensing the hetero atom chosen from an oxygen atom, a sulfur atom, and a nitrogen atom with 1 thru/or 5 which may be included four pieces, 6 membered-ring radical 1, or two pieces in addition to a carbon atom is used. Especially, the heterocycle radical of 1 5 included three pieces thru/or 7 members (preferably 5 or 6 members) is desirable in the hetero atom chosen from an oxygen atom, a sulfur atom, and a nitrogen atom in addition to a carbon atom.

[0010] As a substituent which the "heterocycle radical" of \*\* "the heterocycle radical which may have the substituent" may have For example, a halogen atom (for example, a fluorine, chlorine, a bromine, iodine, etc.), a low-grade alkyl group (for example, methyl, ethyl, propyl, and isopropyl --) Butyl, isobutyl, sec-butyl, tert-butyl, pentyl, Cycloalkyl radicals, such as C1-6 alkyl groups, such as hexyl (For example, C3-6 cycloalkyl radicals, such as cyclo propyl, cyclo butyl, cyclopentyl, and cyclohexyl) etc., A low-grade alkynyl group (for example, C2-6 alkynyl groups, such as ethynyl, 1-propynyl, and propargyl etc.), a low-grade alkenyl radical (for example, vinyl, an allyl compound, isopropenyl, and butenyl --) Aralkyl radicals, such as C2-6 alkenyl radicals, such as iso butenyl (For example, C7-11 aralkyl radicals, such as benzyl, alpha-methylbenzyl, and phenethyl) etc., Aryl group (for example, C6-10 aryl groups, such as phenyl and naphthyl, etc.) They are a phenyl group and a lower alkoxy group (for example) preferably. [ methoxy, ] [ ethoxy \*\*] Propoxy one, isopropoxy, butoxy one, iso butoxy, sec-butoxy, Aryloxy groups, such as C1-6 alkoxy groups, such as tert-butoxy A low-grade (alkanoyl [ for example, ], such as C6-10 aryloxy groups, such as phenoxy) radical (For example, C1-6 alkanoyl radicals, such as formyl, acetyl, a propionyl, butyryl, and isobutyryl) etc., Aryl carbonyl (for example, C6-10 aryl carbonyl groups, such as benzoyl and a naphthoyl radical etc.), a low-grade alkanoloxo radical (for example, formyloxy one and acetyloxy --) C1-6 alkanoloxo radicals, such as propionyloxy, butyryloxy, and isobutyryloxy etc., An aryl-carbonyloxy group (for example, C6-10 aryl-carbonyloxy groups, such as benzoyloxy one and naphth yloxy etc.), a carboxyl group and a low-grade alkoxy carbonyl group (for example, methoxycarbonyl --) Ethoxycarbonyl, propoxy carbonyl, isopropoxycarbonyl, C1-6 alkoxy-carbonyl groups, such as butoxycarbonyl, iso butoxycarbonyl, and tert-butoxycarbonyl etc., Aralkyloxy carbonyl (for example, C7-11 aralkyloxy carbonyl groups, such as benzyloxycarbonyl etc.), A carbamoyl group, Monod, G, or Tori-halogeno-low-grade alkyl group for example, Monod, such as chloro methyl, dichloro methyl, trifluoromethyl, 2 and 2, and 2-trifluoroethyl, -- Oxo-radicals, such as G or Tori-halogeno-C1-4 alkyl group, an amidino group, an imino group, the amino group, and a Monod low-grade alkylamino radical (for example, methylamino --) Monod C1-4 alkylamino radicals, such as ethylamino, propylamino, isopropylamino, and butylamino etc., a G low-grade alkylamino radical (for example, dimethylamino and diethylamino --) G C1-4 alkylamino radicals, such as dipropylamino, diisopropylamino, and dibutylamino etc., The hetero atom chosen from the oxygen atom, the sulfur atom, and the nitrogen atom in addition to a carbon atom and one nitrogen atom The annular amino group of 1 3 which may be included three pieces thru/or 6 members for example, aziridinyl, azetidiny, pyrrolidinyl, and pylori nil -- Pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, imidazolidinyl, piperidyl, Mol HORINIRU, dihydropyridinyl pyridinyl N-methyl piperazinyl, Alkylene dioxy radicals, such as an annular amino group of 3 thru/or 6 members, such as N-ethyl piperazinyl (For example, C1-3 alkylene dioxy radicals, such as methylene dioxy and ethylene dioxy) etc., Hydroxyl, a nitro group, a cyano group, a sulfhydryl group, a sulfonic group, a

SURUFINO radical, A phosphono radical, a sulfamoyl group, a monoalkyl sulfamoyl group for example, N-methyl sulfamoyl and N-ethyl sulfamoyl -- Monod C1-6 alkyl sulfamoyl groups, such as N-propyl sulfamoyl, N-isopropyl sulfamoyl, and N-butyl sulfamoyl etc., a dialkyl sulfamoyl group (for example, N and N-dimethyl sulfamoyl --) N and N-diethyl sulfamoyl, N, and N-dipropyl sulfamoyl, G C1-6 alkyl sulfamoyl groups, such as N and N-dibutyl sulfamoyl etc., an alkylthio group (for example, a methylthio, ethyl thio, and propyl thio --) C1-6 alkylthio groups, such as isopropyl thio, butyl thio, sec-butyl thio, and tert-butyl thio etc., An aryl thio radical (for example, C6-10 aryl thio radicals, such as phenylthio and naphthyl thio etc.), a low-grade alkyl sulfinyl group (for example, methyl sulfinyl and ethyl sulfinyl --) C1-6 alkyl sulfinyl groups, such as propyl sulfinyl, isopropyl sulfinyl, and butyl sulfinyl etc., An aryl sulfinyl group (for example, C6-10 aryl sulfinyl groups, such as phenyl sulfinyl and naphthyl sulfinyl etc.), a low-grade alkyl sulfonyl group (for example, a methyl sulfonyl and an ethyl sulfonyl --) Aryl sulfonyl groups (for example, C6-10 aryl sulfonyl groups, such as a phenyl sulfonyl and a naphthyl sulfonyl etc.), such as C1-6 alkyl sulfonyl groups, such as a propyl sulfonyl, an isopropyl sulfonyl, and a butyl sulfonyl, etc. are used. the "heterocycle radical" of \*\* "the heterocycle radical which may have the substituent" -- the aforementioned substituent -- the replaceable location of a heterocycle radical -- 1 -- or 1 thru/or when you may have three pieces and the number of substituents is two or more pieces, each five substituents are preferably the same -- or you may differ.

[0011] As for the vocabulary "the amino group which may have the substituent" used in this specification, 1 or the amino group which you may have two pieces is raised as a substituent in the above "the hydrocarbon group which may have the substituent" etc. It is the C6-10 aryl group which may have the C1-6 alkyl group which may have the substituent, and the substituent as a desirable thing of the substituent which this "amino group" may have, for example. The thing same as a substituent which \*\* "C1-6 alkyl group" and "C6-10 aryl group" may have as the substituent which the above "a hydrocarbon group" may have is used. the substituent which the "low-grade alkyl group" of the vocabulary "the low-grade alkyl group which may have the substituent" used by this detail letter may show C1-6 alkyl groups, such as methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, isobutyl, sec-butyl, and tert-butyl, etc., and the above "a hydrocarbon group" may have as a substituent -- 1 -- or you may have three pieces. the substituent which the "lower alkoxy group" of the vocabulary "the lower alkoxy group which may have the substituent" used by this detail letter may show C1-6 alkoxy groups, such as methoxy and ethoxy \*\* propoxy, isopropoxy, butoxy one, iso butoxy, sec-butoxy, and tert-butoxy, etc., and the above "a hydrocarbon group" may have as a substituent -- 1 -- or you may have three pieces. As vocabulary "the benzene ring which may have the substituent" used in this specification For example, a halogen atom (for example, a fluorine, chlorine, a bromine, iodine, etc.), The hydrocarbon group which may have the substituent, the amino group which may have the substituent, An amide group (for example, C1-6 acylamino radicals, such as an acetamide, preferably C1-6 alkanoyl-amino radical etc.), The lower alkoxy group, low-grade alkylene dioxy radical which may have the substituent (For example, C1-6 alkylene dioxy radicals, such as methylene dioxy and ethylene dioxy) etc., And the benzene ring which is chosen from the substituent which the "heterocycle radical" of the aforementioned "heterocycle radical which may have the substituent" may have, the same radical, etc. and which may have the same or different 1 thru/or three substituents (preferably 1 or two pieces) in the replaceable location is shown. As these "hydrocarbon groups which may have the substituent", "the amino group which may have the substituent", and "a lower alkoxy group which may have the substituent", what was explained to the detail above, and the same thing are used, for example. each substituent is the same when the number of the substituents which these "hydrocarbon groups", the "amino group", and a "lower alkoxy group" have is two or more -- or you may differ. The benzene ring of \*\* "the benzene ring which may have the substituent" which may be permuted by 1 thru/or three substituents chosen from for example, halogen atoms (for example, a fluorine, chlorine, etc.), C1-6 alkyl groups (for example, methyl, ethyl, etc.), and a Monod C1-6 alkylamino radical is desirable. The vocabulary "the sulfur atom which may have the substituent" used in this specification shows the radical expressed with -SR<sub>4</sub>. Here, R<sub>4</sub> shows the heterocycle radical which may have the hydrocarbon group which may have the hydrogen atom and the substituent,

or the substituent.

[0012] The vocabulary "the carboxyl group which may be esterified" used in this specification shows the radical expressed with  $-\text{COOR}_6$ .  $\text{R}_6$  shows the hydrocarbon group which may have the hydrogen atom or the substituent here. Moreover, the vocabulary "the carboxyl group which may be amidated" used in this specification shows the radical expressed with  $-\text{CONR}$  seven  $\text{R}_8$ . Here, the hydrocarbon group or both which may have the hydrogen atom and the substituent may become together respectively, and  $\text{R}_7$  and  $\text{R}_8$  may form the annular amino group or a heterocycle radical with the nitrogen atom which they combine. Vocabulary used in this specification "the acyl group which may have the substituent" – The radical expressed with  $\text{COR}_9$ ,  $-\text{SOR}_9$ , and  $-\text{SO}$  two  $\text{R}_9$  is shown.  $\text{R}_9$  shows "the above mentioned hydrocarbon group which may have the substituent" and above mentioned "heterocycle radical which may have the substituent" here. In this specification, it sets in  $-\text{NR}$  four  $\text{R}_5$  to "the annular amino group formed with the nitrogen atom which both  $\text{R}_4$  and  $\text{R}_5$  become together, and they combine", and  $-\text{CONR}$  seven  $\text{R}_8$ . As "an annular amino group formed with the nitrogen atom which both  $\text{R}_7$  and  $\text{R}_8$  become together, and they combine" The hetero atom chosen from the oxygen atom, the sulfur atom, and the nitrogen atom in addition to a carbon atom and one nitrogen atom For example, the annular amino group of 1 3 which may be included three pieces thru/or 6 members for example, aziridinyl, azetidiny, pyrrolidinyl, and pylori nil — Annular amino-group Hitoshi of 3 thru/or 6 members, such as pyrrolyl, imidazolyl, pyrazolyl, imidazolidinyl, piperidyl, mol HORINIRU, dihydropyridinyl pyridinyl N-methyl piperazinyl, and N-ethyl piperazinyl, etc. is shown. Preferably, the heterocycle radicals of  $\text{R}_3$  are a nitrogen-containing aroma heterocycle radical, especially the nitrogen-containing aroma heterocycle radical of 6 members, for example, a pyridine ring. As the substituent, the substituent about the aforementioned "heterocycle radical which may have the substituent" is sufficient, and as  $\text{R}_3$ , the nitrogen-containing heterocycle radical and benzene ring condense, and a quinoline ring may be formed. Moreover, the hydrocarbon group of  $\text{X}$  which may have a hydrogen atom, an oxygen atom,  $-\text{OR}_4$  (hydrocarbon group in which it is here and  $\text{R}_4$  may have the hydrogen atom or the substituent), or a substituent is desirable. Hydrocarbon group,  $-\text{COR}_9$ , or  $-\text{COOR}_6$  of  $\text{Y}$  which may have the hydrogen atom and the substituent is desirable, and  $-\text{COR}_9$  or its  $-\text{COOR}_6$  is more desirable. The hydrocarbon group (hydrocarbon group in which it is here and  $\text{R}_4$  may have the hydrogen atom or the substituent) of  $\text{Z}$  which may have a hydrogen atom, an oxygen atom,  $-\text{OR}_4$ , or a substituent is desirable. As isocyclic ring of "the allotropy of 5 which may have the substituent thru/or 7 members or heterocycle" expressed with A ring or B ring, for example, a cyclopentane, a cyclohexane, cycloheptane, cyclopentene, a cyclopentadiene, a cyclohexene, cyclohexadiene, benzene, a cyclo heptene, cycloheptane diene, etc. are mentioned, benzene, a cyclopentane, a cyclohexane, and cycloheptane are desirable and benzene is especially desirable. As heterocycle of "the allotropy of 5 which may have the substituent thru/or 7 members or heterocycle" expressed with A ring or B ring For example, a furan, a thiophene, a pyrrole, oxazole, an isoxazole, A thiazole, an iso thiazole, an imidazole, a pyrazole, OKISA diazole, Furazan, thiadiazole, triazole, a pyridine, pyridazine, Aromatic heterocycles, such as a pyrimidine, pyrazine, and triazine, azetidine, The non-aromatic heterocycle with which the part or all the double bonds of non-aromatic heterocycles, such as oxetane, a pyrrolidine, a piperidine, tetrahydropyran, a morpholine, a thio morpholine, and a piperazine, or an aromatic heterocycle were saturated is mentioned. As a substituent of "the allotropy of 5 which may have the substituent thru/or 7 members or heterocycle" expressed with A ring or B ring, the same number as the substituent of the aforementioned "heterocycle radical which may have the substituent", and the same thing are mentioned. As for  $n$ , 0 is desirable.

[0013] The heterocycle radicals of  $\text{R}_{3a}$  are a nitrogen-containing aroma heterocycle radical, especially the nitrogen-containing aroma heterocycle radical of 6 members, for example, a pyridine ring, preferably to the partial saturation monocycle type heterocycle radical and pan which contain one nitrogen atom and one sulfur atom as the partial saturation heterocycle radical which contains two or less nitrogen atoms as a hetero atom, or a hetero atom. As the substituent, the substituent about the aforementioned "heterocycle radical which may have the substituent" is sufficient, and as  $\text{R}_{3a}$ , the nitrogen-containing heterocycle radical and benzene

ring condense, and a quinoline ring may be formed. As a partial saturation monocycle type heterocycle radical which contains one nitrogen atom and one sulfur atom as the partial saturation heterocycle radical which contains two or less nitrogen atoms as a hetero atom of R3ab, or a hetero atom, a nitrogen-containing aroma heterocycle radical, especially the nitrogen-containing aroma heterocycle radical of 6 members, for example, a pyridine ring, are mentioned preferably. As the substituent, the substituent about the aforementioned "heterocycle radical which may have the substituent" is sufficient, and as R3ab, the nitrogen-containing heterocycle radical and benzene ring condense, and a quinoline ring may be formed. moreover, the compound (Ia) of the benzene ring with which Ba ring may have the substituent by the nitrogen-containing aroma heterocycle radical on which oxygen atom or -OR4a (hydrocarbon group in which R4a may have the hydrogen atom or the substituent) of Xa may be desirable, its benzene ring which may have the substituent as B ring and a Ba ring may be desirable, and R3a or R3ab may have the substituent especially -- or (Ia') it is desirable. As for m, 0 is desirable.

[0014] a compound (I) and (Ia) — or (Ia') shows a desirable embodiment below.

— By the partial saturation heterocycle radical on which the compound (I) with which X and Y may become together and R2 may form A ring by no permuting or the hydrogen atom, and R3 may have the substituent and which contains only one nitrogen atom as a hetero atom The compound (I) which is the allotropy or heterocycle of 5 in which the compound (I) whose n is 0, and Y and Z may form B ring in, and B ring may have the substituent thru/or 7 members, and the hydrocarbon group of R1 and R2 The compound (I) which is an aliphatic hydrocarbon radical, a monocycle type saturated hydrocarbon radical, or an aromatic hydrocarbon radical respectively, and the hydrocarbon group of R1 and R2 Respectively The alkyl group of a carbon number 1 thru/or 16, an alkenyl radical, an alkynyl group, (Compound I) and X whose allotropy or heterocycle radical of (Compound I) and A ring which is a cycloalkyl radical or an aryl group, or B ring is monocycle type saturated hydrocarbon, the benzene ring, a pyridine ring, or a thiophene ring are a hydrogen atom, an oxygen atom, and -OR4 (R4 shows the above and this meaning.). Or the compound whose (Compound I) and Y which may have the substituent, and which is a hydrocarbon group are -COR9 or -COOR6 (R6 and R9 show the above and this meaning.) (I)

— The hydrocarbon group of (Compound I) and R1a whose Z is a hydrogen atom, an oxygen atom, -OR4 (R4 shows the above and this meaning.), or the hydrocarbon group that may be permuted, and R2a The hydrocarbon group of compound (Ia) and R1a which is an aliphatic hydrocarbon radical, a monocycle type saturated hydrocarbon radical, or an aromatic hydrocarbon radical respectively, and R2a Respectively The alkyl group of a carbon number 1 thru/or 16, an alkenyl radical, an alkynyl group, The compound (Ia) whose allotropy or heterocycle radical of compound (Ia) and Ba ring which is a cycloalkyl radical or an aryl group is monocycle type saturated hydrocarbon, the benzene ring, a pyridine ring, or a thiophene ring, and Xa are hydrogen atom, oxygen atom, and -OR4a (R4a shows the above and this meaning.). Or compound (Ia), R1a, and R2a which may have the substituent and which are a hydrocarbon group Respectively The alkyl group of a carbon number 1 thru/or 16, an alkenyl radical, an alkynyl group, The compound (Ia') and R3ab which is a cycloalkyl radical or an aryl group (1) halogen atom, (2) Low-grade alkyl group and (3) cycloalkyl radical, (4) low-grade alkynyl group, (5) A low-grade alkenyl radical, (6) aralkyl radical, (7) aryl groups, (8) A lower alkoxy group, (9) aryloxy groups, (10) low-grade alkanoyl radical, (11) Aryl carbonyl, (12) low-grade alkanoloxo radical, (13) An aryl-carbonyloxy group, (14) carboxyl groups, a (15) low-grade alkoxy carbonyl group, (16) An aralkyloxy carbonyl group, (17) carbamoyl groups, (18) A Monod, G, or Tori-halogeno-low-grade alkyl group, (19) amidino groups, (20) The amino group, (21) Monod low-grade alkylamino radical, (22) G low-grade alkylamino radical, (23) The hetero atom chosen from the oxygen atom, the sulfur atom, and the nitrogen atom in addition to a carbon atom and one nitrogen atom 1 3 which may be included three pieces thru/or annular amino group of 6 members, (24) An alkylene dioxy radical, (25) hydroxyls, (26) nitro groups, (27) A cyano group, (28) sulfhydryl groups, (29) sulfonic groups, (30) SURUFINO radical, (31) A phosphono radical, (32) sulfamoyl groups, (33) monoalkyl sulfamoyl group, (34) A dialkyl sulfamoyl group, (35) alkylthio groups, (36) aryl thio radical, (37) A low-grade alkyl sulfinyl group, (38) aryl sulfinyl group, (39) — the compound (Ia') which is pilus JINIRU which may be permuted by the low-grade alkyl sulfonyl group or (40) aryl sulfonyl group, and Xa



— oxygen atom or —OR<sub>4a</sub> (R<sub>4a</sub> — a hydrogen atom or (1) halogen atom —) (2) A nitro group, (3) cyano groups, (4) hydroxyls, the low-grade alkyl group by which (5) halogenation may be carried out, (6) A lower alkoxy group, (7) amino groups, (8) Monod low-grade alkylamino radical, (9) A G low-grade alkylamino radical, (10) carboxyl groups, a (11) low-grade alkyl-carbonyl group, (12) A low-grade alkoxy-carbonyl group, (13) carbamoyl groups, (14) A Monod low-grade alkyl carbamoyl group, (15) G low-grade alkyl carbamoyl group, (16) The compound (Ia') and R<sub>3ab</sub> which is the hydrocarbon group which may be permuted by the low-grade alkyl carbonylamino radical by which an aryl carbamoyl group, (17) aryl groups, (18) aryloxy groups, or (19) halogenation may be carried out by the nitrogen-containing aroma heterocycle radical The hydrocarbon group in which Ba ring may have (1) halogen atom and (2) substituents, (3) The amino group which may have the substituent, the lower alkoxy group which may have (4) substituents, (5) Low-grade alkylene dioxy radical, (6) aryloxy group, and (7) low-grade alkanoyl radical, (8) An aryl carbonyl group, (9) low-grade alkanoloxo radical, (10) aryl-carbonyloxy groups, (11) A carboxyl group, a (12) low-grade alkoxy carbonyl group, (13) aralkyloxy carbonyl group, (14) A carbamoyl group, (15) Monod, G, or a Tori-halogeno-low-grade alkyl group, (16) An amidino group, (17) amino groups, (18) Monod low-grade alkylamino radical, (19) In addition to a G low-grade alkylamino radical, (20) carbon atom, and one nitrogen atom, oxygen atom, The hetero atom chosen from the sulfur atom and the nitrogen atom 1 3 which may be included three pieces thru/or the annular amino group of 6 members, (21) An alkylene dioxy radical, (22) hydroxyls, (23) nitro groups, (24) A cyano group, (25) sulfhydryl groups, (26) sulfonic groups, (27) SURUFINO radical, (28) A phosphono radical, (29) sulfamoyl groups, (30) monoalkyl sulfamoyl group, (31) A dialkyl sulfamoyl group, (32) alkyl sulfanil group, (33) An aryl sulfanil group, (34) low-grade alkyl sulfinyl group, (35) — the compound (Ia') which is the benzene ring which may be permuted by the aryl sulfinyl group, (36) low-grade alkyl sulfonyl group, or (37) aryl sulfonyl group — an especially desirable compound (Ia) — or (Ia') — \*\*\*\*\* — for example 6, 7-difluoro-3-methyl-1-(2-pilus NINIRU)-1, 9-dihydro-4H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline-4-ON, 3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-6-trifluoromethyl - 1 Nine - Dihydro-4H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline-4-ON, 6-fluoro-3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-1, 9-dihydro-4H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline-4-ON, 7-fluoro-3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-1, 9-dihydro-4H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline-4-ON, 3-ethyl -6, 7-difluoro-1-(2-pilus JINIRU)-1, 9-dihydro-4H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline-4-ON, 6, 7-difluoro-3-methyl-1-(3-pilus JINIRU)-1, 9-dihydro-4H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline-4-ON, 6, 7-difluoro-3-methyl-1-(6-methyl-2-pilus JINIRU)-1, 9-dihydro-4H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline-4-ON, 6, 7-difluoro-3-methyl-1-(6-phenyl-2-pilus JINIRU)-1, 9-dihydro-4H-pyrazolo [— three — four - b —] — a quinoline - four - ON — five - fluoro - three - methyl - one - (2-pilus JINIRU) - one — nine - dihydro one - four — H - pyrazolo — [— three — four - b —] — a quinoline - four - ON — and — one - (2-pilus JINIRU) - one — nine - dihydro one - — four - H - pyrazolo — [— three — four - b —] — a quinoline — — four - ON — etc. etc. — mentioning — having — .

[0015] The salt permitted in pharmacology as a compound (I) and a salt which (Ia) Reaches (Ia'), for example is used. For example, a salt with a salt with an inorganic base, a salt with an organic base, a salt with an inorganic acid, a salt with an organic acid, basicity, or acidic amino acid etc. is mentioned. As a suitable example of a salt with an inorganic base, alkaline-earth-metal salts, such as alkali-metal salts, such as sodium salt and potassium salt, a calcium salt, and magnesium salt, and an aluminum salt, ammonium salt, etc. are mentioned, for example. As a suitable example of a salt with an organic base, a salt with trimethylamine, triethylamine, pyridine, picoline, 2, 6-lutidine, ethanolamine, diethanolamine, triethanolamine, cyclohexylamine, dicyclohexylamine, N, and N-dibenzyl ethylenediamine etc. is mentioned, for example. As a suitable example of a salt with an inorganic acid, a salt with a hydrochloric acid, a hydrobromic acid, a nitric acid, a sulfuric acid, a phosphoric acid, etc. is mentioned, for example. As a suitable example of a salt with an organic acid, a salt with a formic acid, an acetic acid, trifluoroacetic acid, a phthalic acid, a fumaric acid, oxalic acid, a tartaric acid, a maleic acid, a citric acid, a succinic acid, a malic acid, methansulfonic acid, benzenesulfonic acid, p-toluenesulfonic acid, etc. is mentioned, for example. As a suitable example of a salt with a basic amino acid, a salt with an arginine, a lysine, an ornithine, etc. is mentioned and a salt with an aspartic acid, glutamic acid,

etc. is mentioned as a suitable example of a salt with acidic amino acid, for example. A permissible salt is especially pharmacologically desirable. As the example In having a basic functional group in a compound (I), (Ia), and (Ia') inside For example, a salt with inorganic acids, such as a hydrochloric acid, a hydrobromic acid, a nitric acid, a sulfuric acid, and a phosphoric acid For example, an acetic acid, a phthalic acid, a fumaric acid, a tartaric acid, a maleic acid, a citric acid, When a salt with organic acids, such as a succinic acid, methansulfonic acid, and p-toluenesulfonic acid, is mentioned and it has an acid functional group, alkaline-earth-metal salts, such as alkali-metal salts, such as sodium salt and potassium salt, a calcium salt, and magnesium salt, ammonium salt, etc. are mentioned.

[0016] According to the approach of a publication, it can manufacture in for example, a compound (I), (Ia), and (Ia') WO 01/No. 72749 official report.

[0017] As "a compound which has COX inhibitory action" used by this invention, it is not restricted to the above-mentioned instantiation and the compound accepted to have COX inhibitory action in the following screening can also be used.

(Screening of COX inhibitory action) A trial compound is added after mixing the microsome fraction and cofactor (1 M Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA, 1.0 % Tween 20, and 50 mM the luminol, 100 mM hematin) containing COX-1 or COX-2, and it puts for 25 minutes at 37 degrees C. By adding an arachidonic acid (20 mM), a reaction is made to start and the amount of chemiluminescence for 10 seconds after immediately after arachidonic-acid addition is measured using Rumi Starr (Lumistar (BMG Labtechnologies GmbH)). It is [ flurbiprofen / (4 mM) ] the enzyme activity at the time of additive-free about 0 %, a contrast compound, and a trial compound in the enzyme activity at the time of addition as a contrast compound 100% 50% inhibition concentration (IC50) (concentration required in order to control enzyme activity 50%) carry out and concerning enzyme activity is about 100.  $\mu$ M Let the compound which is the following be "the compound which has COX inhibitory action."

[0018] Moreover, as for COX inhibitory action, what is COX-2 alternative inhibitory action is more desirable.

[0019] The screening approach (A) of this invention is the approach of choosing necrosis and/or the weak compound of an apoptosis induction operation from the compounds which have COX inhibitory action using an alimentary canal mucosal cell, especially a gastric-mucosa cell culture system. Necrosis and/or the weak compound of an apoptosis induction operation mean the compound whose effective 50% concentration (ED50) (concentration required in order to guide necrosis and/or apoptosis to 50% of cell) about necrosis and/or apoptosis induction is more than about 100 $\mu$ M. The screening approach (A) of this invention is explained in full detail below.

[0020] The stomach taken out from the preparation guinea pig (4 weeks old of males) of a gastric-mucosa cell is cut open, and a gastric-mucosa cell is exfoliated after washing. After AKUCHINAZE and KOREGENAZE processing, a cell is the petri dish which carried out the collagen coat, and is cultivated under 0.3% cow blood serum existence for 12 hours. It uses for the assay of the following apoptosis and necrosis, after removing a suspension cell.

[0021] 1. It has COX inhibitory action, the conditions on which various NSAIDs(es) guide necrosis for a penetrable change of the screening approach film of the weak compound of a necrosis induction operation to an index in a gastric-mucosa cell are examined, and it is found out that the cell death seen by NSAIDs processing for 1 hour is necrosis (Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.281, G1092-G1100, 2001). Necrosis is detectable by investigating the cell death in 0.5 - 2-hour (preferably 1 hour) processing of NSAIDs to be examined by the trypan blue staining technique (Dig.Dis.Sci.45, 1674-1679, 2000) and the MTT method (Biol.Pharm.Bull.24, 887-891, 2001). By this detection approach, effective 50% concentration (ED50) (concentration required in order to guide necrosis to 50% of cell) about necrosis induction of a trial compound is computable. The more the value which compared the ED50 value which shows a necrosis induction operation of a trial compound with IC50 value which shows COX inhibitory action, and \*\* (ed) (the ED50 value which shows a necrosis induction operation) with (IC50 value which shows COX inhibitory action) is large, it has "COX inhibitory action and, the more is weak compound" of a necrosis induction operation. The ED50 value which has \*\* "COX inhibitory action, and IC50 value which shows COX inhibitory action is the



compound whose ED50 value which shows below about 100microM and a necrosis induction operation is more than about 100microM, and IC50 value which shows COX inhibitory action is below about 20microM more preferably, and shows a necrosis induction operation preferably as weak compound" of a necrosis induction operation is the compound which is more than about 100microM.

[0022] 2. It has COX inhibitory action, the conditions on which various NSAIDs(es) guide apoptosis for the fragmentation of the screening approach DNA of a compound with a weak apoptosis induction operation, condensation of chromatin, and activation of caspase to an index in a gastric-mucosa cell are examined, and it is found out that the cell death seen by NSAIDs processing for 16 hours is apoptosis (Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.281, G1092-G1100, 2001). Apoptosis is detectable by investigating the cell death in 8 - 48-hour (preferably 12 - 24 hours, more preferably 16 hours) processing of NSAIDs to be examined by the trypan blue staining technique (Dig.Dis.Sci.45, 1674-1679, 2000) and the MTT method (Biol.Pharm.Bull.24, 887-891, 2001). By this detection approach, effective 50% concentration (ED50) (concentration required in order to guide apoptosis to 50% of cell) about apoptosis induction of a trial compound is computable. The more the value which compared the ED50 value which shows an apoptosis induction operation of a trial compound with IC50 value which shows COX inhibitory action, and \*(ed) (the ED50 value which shows an apoptosis induction operation) with (IC50 value which shows COX inhibitory action) is large, it has "COX inhibitory action and, the more is weak compound" of an apoptosis induction operation. The ED50 value which has \*\* "COX inhibitory action, and IC50 value which shows COX inhibitory action is the compound whose ED50 value which shows below about 100microM and an apoptosis induction operation is more than about 100microM, and IC50 value which shows COX inhibitory action is below about 20microM more preferably, and shows an apoptosis induction operation preferably as weak compound" of an apoptosis induction operation is the compound which is more than about 100microM. Moreover, after replacing with the above-mentioned screening approach (A) and choosing necrosis and/or the weak compound of an apoptosis induction operation, also by detecting COX inhibitory action under existence of the necrosis concerned and/or the weak compound of an apoptosis induction operation, it has "COX inhibitory action and weak compound" of necrosis and/or an apoptosis induction operation can be chosen.

[0023] Moreover, in the above-mentioned screening approach (A), the compound which has necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action can be screened by making the compound and trial compound which have necrosis and/or an apoptosis induction operation live together. That is, the screening approach (B) of this invention is the approach of choosing the compound which has necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action from the compounds which use an alimentary canal mucosal cell, especially a gastric-mucosa cell culture system for the bottom of existence of the compound which has necrosis and/or an apoptosis induction operation, and have COX inhibitory action. The compound in which necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action are shown usually means the compound whose 50% inhibition concentration (IC50) (concentration required in order to control the necrosis and/or apoptosis which were guided 50%) about necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action is below about 100microM. As a compound which has the necrosis induction operation used here, indomethacin, aspirin, dichlofenac, etc. are mentioned, for example and indomethacin etc. is used preferably especially. Moreover, as a compound which has an apoptosis induction operation, indomethacin, aspirin, dichlofenac, etc. are mentioned and indomethacin etc. is used preferably especially. The screening approach of a compound of having the screening approach, COX inhibitory action, and apoptosis induction inhibitory action of the compound which has COX inhibitory action and necrosis induction inhibitory action below is explained in full detail.

[0024] 3. The conditions on which various NSAIDs(es) guide necrosis for a penetrable change of the screening approach film of the compound which has COX inhibitory action and necrosis induction inhibitory action to an index in a gastric-mucosa cell are examined, and it is found out that the cell death seen by NSAIDs processing for 1 hour is necrosis (Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.281, G1092-G1100, 2001). Necrosis is detectable by investigating the cell death in 0.5 - 2-hour (preferably 1 hour) processing of NSAIDs to be

examined by the trypan blue staining technique (Dig.Dis.Sci.45, 1674-1679, 2000) and the MTT method (Biol.Pharm.Bull.24, 887-891, 2001). By making a trial compound live together in the evaluation system which guides necrosis in a NSAIDs processing gastric-mucosa cell for these 0.5 to 2 hours (preferably 1 hour), 50% inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) (concentration required in order to control the guided necrosis 50%) about the necrosis induction inhibitory action of a trial compound is computable. As a compound in which necrosis induction inhibitory action is shown, it is the compound the IC<sub>50</sub> value of whose is below about 100microM preferably, and is the compound the IC<sub>50</sub> value of whose is below about 20microM more preferably.

[0025] 4. The conditions on which various NSAIDs(es) guide apoptosis for the fragmentation of the screening approach DNA of a compound which has COX inhibitory action and apoptosis induction inhibitory action, condensation of chromatin, and activation of caspase to an index in a gastric-mucosa cell are examined, and it is found out that the cell death seen by NSAIDs processing for 16 hours is apoptosis (Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.281, G1092-G1100, 2001). Apoptosis is detectable by investigating the cell death in 8 - 48-hour (preferably 12 - 24 hours, more preferably 16 hours) processing of NSAIDs to be examined by the trypan blue staining technique (Dig.Dis.Sci.45, 1674-1679, 2000) and the MTT method (Biol.Pharm.Bull.24, 887-891, 2001). By making a trial compound live together in the evaluation system which guides apoptosis in a NSAIDs processing gastric-mucosa cell for these 8 to 24 hours (preferably 12 - 24 hours, more preferably 16 hours), 50% inhibition concentration (IC<sub>50</sub>) (concentration required in order to control the guided apoptosis 50%) about the apoptosis induction inhibitory action of a trial compound is computable. As a compound in which apoptosis induction inhibitory action is shown, it is the compound the IC<sub>50</sub> value of whose is below about 100microM preferably, and is the compound the IC<sub>50</sub> value of whose is below about 20microM more preferably. Moreover, "the compound which has COX inhibitory action and has necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action" can be chosen also by replacing with the above-mentioned screening approach (B), and detecting COX inhibitory action under existence of the compound which has the necrosis concerned and/or apoptosis induction inhibitory action, after choosing the compound which has necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action.

[0026] The compound obtained by the above-mentioned screening approach may form the salt, and a permissible salt etc. is pharmacologically used as this salt, for example. For example, a salt with a salt with an inorganic base, a salt with an organic base, a salt with an inorganic acid, a salt with an organic acid, basicity, or acidic amino acid etc. is raised. As a suitable example of a salt with an inorganic base, alkaline-earth-metal salts, such as alkali-metal salts, such as sodium salt and potassium salt, a calcium salt, and magnesium salt, and an aluminum salt, ammonium salt, etc. are raised, for example. As a suitable example of a salt with an organic base, a salt with trimethylamine, triethylamine, pyridine, picoline, 2, 6-lutidine, ethanolamine, diethanolamine, triethanolamine, cyclohexylamine, dicyclohexylamine, N, and N'-dibenzyl ethylenediamine etc. is raised, for example. As a suitable example of a salt with an inorganic acid, a salt with a hydrochloric acid, a hydrobromic acid, a sulfuric acid, a phosphoric acid, etc. is raised, for example. As a suitable example of a salt with an organic acid, a salt with a formic acid, an acetic acid, a propionic acid, a fumaric acid, oxalic acid, a tartaric acid, a maleic acid, a citric acid, a succinic acid, a malic acid, methansulfonic acid, benzenesulfonic acid, a benzoic acid, etc. is raised, for example. As a suitable example of a salt with a basic amino acid, a salt with an arginine, a lysine, ORUCHININ, etc. is raised, for example, and a salt with an aspartic acid, glutamic acid, etc. is raised as a suitable example with acidic amino acid, for example.

[0027] It has (1) COX inhibitory action obtained by the screening approach (A) of this invention. It has necrosis and/or the weak compound of an apoptosis induction operation, and (2) COX inhibitory action obtained by the screening approach (B) of this invention. And the compound which has necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action It is useful as outstanding NSAIDs without the side effect of an alimentary canal membrane failure, especially a gastric-mucosa failure, and can use for insurance in Homo sapiens and animals (for example, a mouse, a rat, a guinea pig, a cat, a dog, a sheep, a horse, a cow, an ape, etc.). It has the COX inhibitory action obtained by the screening approach (A) of this invention. It has necrosis and/or the weak compound of an apoptosis induction operation, and the COX inhibitory action obtained by the

screening approach (B) of this invention. And the compound which has necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action For example, a pain (for example, it is based on a cancer pain, the acute pain by inflammation, and the chronic inflammation, and hurts) postoperative pains (the pain of an incision, a deep-seated pain, a visceral pain, postoperative chronic pain, etc.), and muscular pain (the muscular pain accompanying a chronic pain disease --) arthralgia, such as stiffness in shoulder, the toothache, a temporomandibular-joint pain, and a headache (migraine and a stress mold headache --) visceral pains (the cardiodynia and anginal pain --), such as a headache accompanying fever, and a headache accompanying hypertension pains (the Mittelschmerz --) of an obstetrics-and-gynecology field, such as abdominal pain, a pain of the kidney, a pain of a ureter, and a pain of a bladder neuralgia (a herniated disk, a root pain, and postherpetic neuralgia --), such as dysmenorrhea and labor pains trigeminal neuralgia etc. -- etc. -- an inflammatory disease (pain generation of heat, a retinopathy, a nephropathy, and neuropathy --) Diabetic complication, such as a large artery failure, rheumatism, rheumatoid arthritis, hypertrophic arthritis, Arthritis, such as a rheumatism Mr. myelitis, gouty arthritis, and periostitis, low back pain, gout, The inflammation after an operation and a trauma, the remission of swelling, neuralgia, a pharyngitis, cystitis, the chronic hepatitis, Inflammatory bowel disease, such as acute pancreatitis, chronic pancreatitis, Crohn's disease, and ulcerative colitis, Inflammatory lung diseases, such as meningitis, an inflammatory eye disease, pneumonia, silicosis, pulmonary sarcoidosis, and pulmonary tuberculosis etc., An allergic disease (asthma, atopic dermatitis, chronic obstructive pulmonary disease, etc.), a central-nerves failure (spine damage cerebrovascular disease, such as cerebral hemorrhage and cerebral infarction, and a craniocerebral trauma --) neurodegenerative diseases (an Alzheimer disease and Parkinson's disease --), such as cerebral edema and multiple sclerosis Generalized ERISEMATODESU, such as amyotrophic lateralsclerosis and acquired immunodeficiency syndrome encephalopathy, psoriasis, A bladder cancer, a breast cancer, a neck-of-uterus gun, a chronic lymphoid leucocyte, chronic myelogenous leukemia, A large intestine gun, a join intestinal cancer, a rectum gun, the Helicobacter Pylori infectious disease, Hodgkin's disease, Insulin dependent diabetes mellitus, a malignant melanoma, a multiple myeloma, a non-HOJIKIN nature lymphoma, Non-small-cell lung cancer, an ovarian cancer, a peptic ulcer, a prostatic cancer, infertility, a BECHUTTO disease, A generalized mycosis, acute bacteria meningitis, acute myocardial infarction, acute viral encephalitis, Adult respiratory distress syndrome, bacteria pneumonia, a herpes simplex virus infectious disease, A varicella-zoster-virus infectious disease, AIDS, a Homo sapiens papillomavirus infectious disease, It is useful as prevention / therapy agents, such as influenza, an invasiveness staphylococcus infectious disease, septicemia, interstitial liver disease, situation nature ileitis, and circulatory system diseases (angina pectoris, myocardial infarction, congestive heart failure, the disseminated intravascular coagulation, arteriosclerosis, peripheral vascular disease, etc.).

[0028] It has (1) COX inhibitory action obtained by the screening approach (A) of this invention. It has necrosis and/or the weak compound of an apoptosis induction operation, and (2) COX inhibitory action obtained by the screening approach (B) of this invention. and prevention of various kinds of diseases according [ the compound which has necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action ] to COX inhibition activity and a therapy -- setting -- the very thing -- insurance can be medicated as a physic constituent which mixed the support permitted in pharmacology by the well-known approach. the case where a medicine is prescribed for the patient as an oral agent, for example to an adult although this dose changes with the administration root for administration, diseases, etc. -- about 0.1 thru/or 20 mg/kg weight -- desirable -- about 0.2 thru/or 10 mg/kg weight -- it is about 0.5 thru/or 10 mg/kg weight still more preferably, and a medicine can be prescribed for the patient in 1 thru/or several steps for one day.

[0029] An excipient [ in / the various organic one of the common use as a pharmaceutical preparation material as support or the inorganic support matter which may be used for manufacture of the physic constituent of this invention and which is permitted in pharmacology is raised, for example, / solid preparations ], lubricant, a binder, disintegrator; the solvent in liquid preparations, a solubilizing agent, a suspending agent, an isotonicizing agent, a buffer, an aponia-

ized agent, etc. are raised. Moreover, additives, such as the usual antiseptics, an anti-oxidant, a coloring agent, a sweetening agent, an adsorbent, and a wetting agent, can also be used if needed.

[0030] As an excipient, a lactose, white soft sugar, D-mannitol, starch, corn starch, crystalline cellulose, light anhydrous silicic acid, etc. are mentioned, for example. As lubricant, magnesium stearate, calcium stearate, talc, a colloidal silica, etc. are mentioned, for example. As a binder, crystalline cellulose, white soft sugar, D-mannitol, a dextrin, hydroxypropylcellulose, the hydroxypropyl methylcellulose, a polyvinyl pyrrolidone, starch, cane sugar, gelatin, methyl cellulose, carboxymethylcellulose sodium, etc. are mentioned, for example. As disintegrator, starch, a carboxymethyl cellulose, carboxymethyl-cellulose calcium, cross carmellose sodium, carboxy-methyl-starch sodium, L-hydroxypropylcellulose, etc. are mentioned, for example. As a solvent, water for injection, alcohol, propylene glycol, macro gall, sesame oil, corn oil, olive oil, etc. are mentioned, for example. As a solubilizing agent, a polyethylene glycol, propylene glycol, D-mannitol, benzyl benzoate, ethanol, tris aminomethane, cholesterol, triethanolamine, a sodium carbonate, a sodium citrate, etc. are mentioned, for example.

[0031] As a suspending agent, hydrophilic macromolecules, such as surface-active-agents [such as stearyl triethanolamine sodium lauryl sulfate, lauryl aminopropionic acid, lecithin, a benzalkonium chloride benzethonium chloride, and glyceryl monostearate, ], for example, polyvinyl alcohol, a polyvinyl pyrrolidone, carboxymethylcellulose sodium, methyl cellulose, a hydroxymethyl cellulose, hydroxyethyl cellulose, and hydroxypropylcellulose, etc. are mentioned, for example. As an isotonicizing agent, they are grape sugar, for example, D-sorbitol, a sodium chloride, a glycerol, D-mannitol, etc. are mentioned. As a buffer, the buffer solutions, such as phosphate, acetate, a carbonate, and citrate, etc. are mentioned, for example. As an aponia-ized agent, benzyl alcohol etc. is mentioned, for example. As antiseptics, p-hydroxybenzoic esters, chlorobutanol, benzyl alcohol, phenethyl alcohol, a dehydroacetic acid, a sorbic acid, etc. are mentioned, for example. As an anti-oxidant, a sulfite, an ascorbic acid, the alpha-tocopherol, etc. are mentioned, for example.

[0032] Moreover, the physic constituent of this invention can be used combining drugs (it is hereafter written as a concomitant drug agent), such as a diabetes-mellitus therapy agent, a diabetic complication therapy agent, an antilipemic, a hypotensor, a diuretic, a chemotherapeutic drug, and an immunotherapy agent. Moreover, the physic constituent of this invention itself can also contain these concomitant drug agent. Especially in this specification, as long as there is no notice, when only expressing it as "concomitant use", you may be any of the gestalt used as a mixture as the gestalt prescribed for the patient with separate drugs, and one drugs. It may not be limited, but in case it is used combining as separate drugs, to the candidate for administration, coincidence may be medicated with the administration stage of \*\* of this invention, and a concomitant drug agent, time difference may be set and it may prescribe these for the patient. Furthermore, two or more sorts may be combined and used for a concomitant drug agent at a proper rate. The dose of a concomitant drug agent can be suitably chosen on the basis of the dosage used on clinical [ of each drugs ]. Moreover, the compounding ratio of \*\* of this invention and a concomitant drug agent can be suitably chosen with the administration root for administration, an object disease, a symptom, combination, etc.

[0033]

[Embodiment of the Invention] Although the example of reference, the example of manufacture, the example of an experiment, and an example are given to below and this invention is explained more to a detail, these do not limit the range of this invention. The "room temperature" in the following examples of manufacture usually shows about 10 to about 35 degrees C. % Unless it mentions specially, percentage by weight is shown. Silica gel shows Chromatorex NH-DM1020, 0.100-0.200mm, and the (Fuji SHIRISHIA chemistry), when Kieselgel 60 and 0.063-0.200mm (Merck) are shown and it is indicated as basic silica gel, unless it mentions specially. The genetic manipulation method given in the following examples of an experiment followed the approach indicated by the attachment protocol of the approach or reagent indicated by Maniatis et al. (Maniatis) and molecular cloning (ColdSpring Harbor Laboratory, 1989). The cable address used in the other texts shows following semantics.

s : Singlet (singlet)

d : Doublet (doublet)

t : Triplet (triplet)

q : KUARUTETTO (quartet)

m : Multiplet (multiplet)

br : Broadcloth (broad)

J : Coupling constant (coupling constant)

Hz : Hertz (Hertz)

CDCl<sub>3</sub> : Heavy chloroform DMSO-d<sub>6</sub> : Heavy dimethyl sulfoxide NMR : Proton nuclear magnetic resonance [0034]

[Example] Example 1 of manufacture It manufactured according to 2-hydrazino pyridine Journal of Medicinal Chemistry (J.Med.Chem.), 28 volumes, and the approach of a 1394 pages (1985) publication. The heating reflux of 2-chloropyridine (200 mL, 2.1 mol) and the hydrazine monohydrate (400 mL, 8.2 mol) was carried out for 20 hours. Concentration distilling off of the reaction mixture was carried out under reduced pressure of superfluous hydrazine hydrate after cooling to the room temperature, and water was filled with residue. After adding the sodium-hydroxide solution and making it basicity, chloroform extracted the organic substance. After saturation brine and water washed the extract, it dried with sulfuric anhydride magnesium, the solvent was distilled off under reduced pressure, and the title compound (yield 157 g, 68% of yield) was obtained. This article was used for the following process, without refining more than this.

[0035] Example 2 of manufacture The acetic acid (132 g, 2.2 mol) was added to the ethanol (300 mL) ice-cooling solution of 3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-1H-pyrazole-5-ylamine amino crotononitrile (82 g, 1.0 mol) and 2-hydrazino pyridine (120 g, 1.1 mol), and heating reflux was carried out for 3.5 hours. Concentration distilling off of the reaction mixture was carried out under reduced pressure of a reaction solvent after cooling to the room temperature, and water was added to residue. After adding the sodium-hydroxide water solution furthermore and making it basicity, ethyl acetate extracted the organic substance. After saturation brine and water washed the extract, it dried with sulfuric anhydride magnesium and the solvent was distilled off under reduced pressure. By refining the obtained residue with a silica gel column chromatography (ethyl acetate), the title compound (yield 156.3 g, 90% of yield) was obtained. The 103 to 104 degree C (from ethyl acetate to recrystallization) melting point.

NMR(CDCl<sub>3</sub>) delta: 2.25 (3H, s) and 5.37 (1H, s), 5.92 (2H, br s), 7.07 (1H, m), 7.76 (1H, m), 7.94 (1H, d, J = 7.0 Hz), and 8.32 (1H, d, J = 6.0 Hz).

[0036] Example 3 of manufacture According to Delon Letters (Tetrahedron Lett.), 37 volumes, and the approach of a 2767 pages (1996) publication, it manufactured to the 2-chloro-5-(trifluoromethyl) benzoic-acid tetrapod. 1-chloro-4-(trifluoromethyl) benzene (25.8 g, 143 mmol) and the tetrahydrofuran (250 mL) solution of tetramethylethylenediamine (16.6g, 143 mmol) were cooled to -78 degrees C under argon atmosphere, the 1.6-mol butyl lithium hexane (89.4 mL, 143 mmol) solution was dropped there, and it stirred for 30 minutes by this \*\*. It flowed into the dry ice which broke reaction mixture carefully, and the temperature up was carried out to the room temperature. Water was filled with residue after condensing a solvent under reduced pressure. After washing this by diethylether, concentrated hydrochloric acid was added, it was made acidity, and the organic substance was extracted by dichloromethane. After saturation brine washed the extract, it dried with sulfuric anhydride magnesium and concentration distilling off of the solvent was carried out under reduced pressure. The obtained residue was crystallized from the hexane and the title compound (yield 20.6 g, 64% of yield) was obtained.

NMR(CDCl<sub>3</sub>) delta: 7.65 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.75 (1H, dd, J = 2.2 Hz, 8.4 Hz), 8.31 (1H, d, J = 2.2 Hz), hidden (1H).

[0037] Example 4 of manufacture Under 2-[[3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-1H-pyrazole-5-IRU] Amino]-5-(trifluoromethyl) benzoic-acid argon atmosphere, 3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-1H-pyrazole-5-ylamine (8.71 g --) 50.0 mmol and a 2-chloro-5-(trifluoromethyl) benzoic acid (12.4 g --) The heating reflux of the N.N-dimethylformamide (50 mL) solution of 55.0mmol(s), copper acetate (II) (1.00 g, 5.50 mmol), and potassium carbonate (7.60 g, 55.0 mmol) was carried out for

1.5 hours. Reaction mixture was poured out after cooling and water was poured out with the reaction mixture to the room temperature. After making it the acescence with an acetic-acid solution, the depositing rough crystal was separated. This was air-dried after washing with water, and the title compound (yield 17.7 g, 89% of yield) was obtained.

The 228 to 229 degree C (from ethyl acetate to recrystallization) melting point.

NMR(CDCl<sub>3</sub>) delta: 2.37 (3H, s) and 6.19 (1H, s), 7.13 (1H, ddd, J = 1.0 Hz, 4.8 Hz, 7.4 Hz), 7.70-7.85 (3H, m) and 7.93 (1H, d, J = 8.4 Hz), 8.39 (1H, d, J = 1.8 Hz), 8.45 (1H, ddd, J = 0.8 Hz, 1.8 Hz, 4.8 Hz), 12.46 (1H, br s), and hidden (1H).

Elemental-analysis value: It is referred to as C<sub>17</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, and is calculated-value: C and 56.36; H, 3.62; N, 15.46.

Actual measurement: C, 56.56; H, 3.52; N, 15.63.

[0038] example 5 of manufacture 4-chloro-3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-6-(trifluoromethyl)-1 - a H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline 2-[[3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-1H-pyrazole-5-IRU] amino]-5-(trifluoromethyl) benzoic acid ( ) [ 14.0 ] The heating reflux of the phosphorus oxychloride (27.4 mL, 294 mmol) solution of g and 38.6 mmol was carried out for 1 hour.

Concentration distilling off of the reaction mixture was carried out under reduced pressure of a reaction solvent after cooling to the room temperature, and iced water was filled with residue. After adding the sodium-hydroxide solution and neutralizing, chloroform extracted the organic substance. After saturation brine and water washed the extract, it dried with sulfuric anhydride magnesium and the solvent was distilled off under reduced pressure. The silica gel column chromatography (hexane: chloroform = 1:1 - chloroform) refined the obtained residue, and the title compound (yield 7.07 g, 50% of yield) was obtained.

The melting point of 206 degrees C (from ethyl acetate/methanol to recrystallization).

NMR(CDCl<sub>3</sub>) delta: 3.01 (3H, s), 7.28 (1H, ddd, J = 1.0 Hz, 4.8 Hz, 7.4 Hz), 7.91-7.99 (2H, m), 8.27 (1H, d, J = 9.2 Hz), and 8.68-8.77 (3H, m).

Elemental-analysis value: It is referred to as C<sub>17</sub>H<sub>10</sub>ClF<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, and is calculated-value: C and 56.29; H, 2.78; N, 15.45; Cl, 9.77; F, 15.71.

Actual measurement: C, 56.23; H, 3.00; N, 15.23; Cl, 9.62; F, 15.70.

[0039] Example 6 of manufacture 3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-6-(trifluoromethyl)-1, 9-dihydro-4H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline-4-ON (it is hereafter written as compound A)

6 convention hydrochloric acid (10mL, 60 mmol) was added to the ethanol (300 mL) solution of the 4-chloro-3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-6-(trifluoromethyl)-1H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline (6.50 g, 17.9 mmol), and heating reflux was carried out for 5 hours. The crystal which deposited reaction mixture after cooling to the room temperature was separated. This was air-dried after washing by ethanol, the obtained crystal was \*\*\*\*\*ed from ethanol, and the title compound (yield 4.69 g, 76% of yield) was obtained.

The 250 to 251 degree C (from ethanol to recrystallization) melting point.

NMR(CDCl<sub>3</sub>) delta: 2.74 (3H, s) and 7.26 (1H, ddd, J = 1.2 Hz, 5.0 Hz, 7.2 Hz), 7.53 (1H, d, J = 8.8 Hz) and 7.84 (1H, dd, J = 2.0 Hz, 8.8 Hz), 7.92 (1H, ddd, J = 1.8 Hz, 7.2 Hz, 8.4 Hz), 8.03 (1H, ddd, J = 1.0 Hz, 1.2 Hz, 8.4 Hz), 8.49 (1H, ddd, J = 1.0 Hz, 1.8 Hz, 5.0 Hz), 8.75 (1H, d, J = 2.0 Hz), and 11.65 (1H, br s).

Elemental-analysis value: It is referred to as C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O, and is calculated-value: C and 59.31; H, 3.22; N, 16.27; F, 16.55.

Actual measurement: C, 59.23; H, 3.40; N, 16.00; F, 16.59.

[0040] Example 7 of manufacture 1-(2-pilus JINIRU)-1, 9-dihydro-4H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline-4-ON (it is hereafter written as Compound B)

Diphosphorus pentaoxide (5.00 g, 35.2 mmol) was added to methansulfonic acid (20 mL, 0.31 mol), and it heated at 100 degrees C. The powder of a 2-[1-(2-pilus JINIRU)-1H-pyrazole-5-IRU] amino] benzoic acid (1.94 g, 6.92 mmol) was added small quantity every, stirring this reaction mixture well by this \*. Heating churning of the reaction mixture was carried out for 10 minutes under this temperature. Iced water was added for reaction mixture to the reaction mixture after cooling to the room temperature. After adding the sodium-hydroxide water solution furthermore and making it basicity, ethyl acetate extracted the organic substance. After saturation brine and water washed the extract, it dried with sulfuric anhydride magnesium and



the solvent was distilled off under reduced pressure. The silica gel column chromatography (chloroform: methanol =99:1) refined the obtained residue, and the title compound (yield 1.35 g, yield 74%) was obtained.

The 240 to 242 degree C (from ethanol to recrystallization) melting point.

NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) delta 7.32-7.40 (1H, m), 7.42-7.49 (1H, m) and 7.71-7.80 (1H, m), 7.96-8.01 (1H, m), 8.07-8.15 (2H, m), 8.24-8.29 (1H, m), 8.39 (1H, s), 8.64-8.68 (1H, m), and 12.03 (1H, br s).

Elemental-analysis value: It is referred to as C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O, and is calculated-value:C and 68.69.;

H, 3.84; N, 21.36. Actual measurement: C, 68.68; H, 3.89; N, 21.36. [0041] example 8 of

manufacture 4-chloro-5-fluoro-3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)- under the 1H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline argon atmosphere 3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-1H-pyrazole-5-ylamine (5.23 g --)

30 mmol and a 2-fluoro-6-iodine benzoic acid (9.57 g --) The heating reflux of the N.N-dimethylformamide (30mL) solution of 36 mmol, copper acetate (II) (0.654 g, 3.6 mmol), and

potassium carbonate (4.98 g, 36 mmol) was carried out for 1 hour. Reaction mixture was poured out after cooling and water was poured out with the reaction mixture to the room temperature.

After making it the acescence with an acetic-acid solution, the depositing rough crystal was separated and it was air-dry after washing with water. The obtained rough crystal was dissolved in phosphorus oxychloride (20 mL, 0.21 mol), and heating reflux was carried out for 1 hour.

Concentration distilling off of the reaction mixture was carried out under reduced pressure of a reaction solvent after cooling to the room temperature, and iced water was filled with residue.

After adding the sodium-hydroxide solution and making it basicity, chloroform extracted the organic substance. After saturation brine and water washed the extract, it dried with sulfuric

anhydride magnesium and the solvent was distilled off under reduced pressure. The silica gel column chromatography refined the obtained residue, and the title compound (yield 4.78 g, 51% of yield) was obtained.

The 160 to 161 degree C (from ethyl acetate to recrystallization) melting point.

NMR(CDCl<sub>3</sub>) delta: 3.01 (3H, s), 7.14-7.29 (2H, m), 7.63-7.76 (1H, m), 7.88-8.01 (2H, m), and 8.65-8.78 (2H, m). Elemental-analysis value: It is referred to as C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>ClFN<sub>4</sub>, and is calculated-

value:C and 61.45.; H, 3.22; N, 17.92; Cl, 11.34; F, 6.08. Actual measurement: C, 61.19; H, 3.43; N,

17.94; Cl, 11.23; F, 6.05. [0042] Example 9 of manufacture 5-fluoro-3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-1, 9-dihydro-4H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline-4-ON Hydrochloride (it is hereafter written as Compound C)

6 convention hydrochloric acid (6.25 mL, 38 mmol) was added to the ethanol (60 mL) solution of the 4-chloro-5-fluoro-3-methyl-1-(2-pilus JINIRU)-1H-[3 and 4-pyrazolo b] quinoline (4.78 g,

15 mmol), and heating reflux was carried out for 2 hours. Concentration distilling off of the reaction mixture was carried out under reduced pressure of a reaction solvent after cooling to

the room temperature. After adding the sodium-hydroxide water solution to residue and making it basicity, chloroform extracted the organic substance. After saturation brine and water washed

the extract, it dried with sulfuric anhydride magnesium and the solvent was distilled off under reduced pressure. After the silica gel column chromatography refined the obtained residue, it

changed into the hydrochloride, and the title compound (yield 4.04 g, 80% of yield) was obtained. Melting point >380degree-CNMR(DMSO-d<sub>6</sub>) delta: 2.58 (3H, s), 6.42-6.54 (1H, m) and 7.09-7.29

(3H, m), 7.84-7.95 (1H, m), 8.44 (1H, dd, J = 1.2 Hz, 4.8 Hz), 8.95 (1H, d, J = 8.4 Hz), and hidden (1H). Elemental-analysis value: Consider as C<sub>16</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>4</sub> O-HCl, and it is calculated-value:C and

58.10.; H, 3.66; N, 16.94; F, 5.74. Actual measurement: C, 58.44; H, 3.32; N, 16.83; F, 5.75. [0043]

Example 1 of reference The DNA fragment of 1.8 kb containing Homo sapiens COX-1cDNA

(FASEB J., 5 (9), and 2304-2312 (1991)) acquired by the preparation PCR method of a Homo

sapiens COX-1cDNA recombination baculovirus was inserted in the plasmid pFASTBAC1

(GIBCOBRL), and the plasmid pFBCOX1 was produced. It rearranged using a plasmid pFBCOX1

and BAC-TO-BAC Baculovirus Expression System (GIBCOBRL), and virus stock BAC-COX1 of

a baculovirus was prepared.

[0044] Example 2 of reference It is preparation Sf-21 cell of the microsome fraction from a

COX-1 manifestation insect cell 1x10<sup>6</sup> It is 125 ml so that it may be set to cells/ml. After

carrying out seeding to a Sf-900 II SFM culture medium (GIBCO-BRL), it cultivated at 27

degrees C for 24 hours. It cultivated for further 72 hours, after carrying out 0.75 ml addition of

virus stock BAC-COX1 of a recombination baculovirus. From culture medium, according to centrifugal separation (for 3000 rpm and 10 minutes), after separating a cell, the cell was washed twice by PBS. It is 10 ml about a cell. After suspending in Lysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM EDTA), the cell was crushed by performing processing during 20000 rpm and 20 seconds 3 times with a homogenizer (POLYTRON). The precipitate which carried out centrifugal separation (for 40000 rpm and 45 minutes) of the supernatant liquid obtained by carrying out centrifugal separation (for 2000 rpm and 10 minutes), and obtained it was re-suspended in Lysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 5mM EDTA), and it saved at -80 degrees C.

[0045] Example 3 of reference The DNA fragment of 1.8 kb containing Homo sapiens COX-2cDNA (Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 89 (16), and 7384-7388 (1992)) acquired by the preparation PCR method of a Homo sapiens COX-2cDNA recombination baculovirus was inserted in the plasmid pFASTBAC1 (GIBCOBRL), and the plasmid pFBCOX2 was produced. It rearranged using a plasmid pFBCOX2 and BAC-TO-BAC Baculovirus Expression System (GIBCOBRL), and virus stock BAC-COX2 of a baculovirus was prepared.

[0046] Example 4 of reference It is preparation Sf-21 cell of the microsome fraction from a COX-2 manifestation insect cell 1x10<sup>6</sup> It is 125 ml so that it may be set to cells/ml. After carrying out seeding to a Sf-900 II SFM culture medium (GIBCOBRL), it cultivated at 27 degrees C for 24 hours. It cultivated for further 72 hours, after carrying out 0.75 ml addition of virus stock BAC-COX2 of a recombination baculovirus. From culture medium, according to centrifugal separation (for 3000 rpm and 10 minutes), after separating a cell, the cell was washed twice by PBS. It is 10 ml about a cell. After suspending in Lysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 5mM EDTA), the cell was crushed by performing processing during 20000 rpm and 20 seconds 3 times with a homogenizer (POLYTRON). The precipitate which carried out centrifugal separation (for 40000 rpm and 45 minutes) of the supernatant liquid obtained by carrying out centrifugal separation (for 2000 rpm and 10 minutes), and obtained it was re-suspended in Lysis buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 5mM EDTA), and it saved at -80 degrees C.

[0047] the reaction buffer (M Tris-HCl (pH 8.0) 1 --) of the 10 times many example of trial 1 COX-measurement [ as this ] concentration of 1 and COX-2 inhibition activity 50 mM EDTA, 1.0 % Tween20, 50 mM mul, and microsome fraction Luminol and 100 (COX-1:40 mug --) muM hematin20 COX-2:20 mug20 mul Distilled water 55 It is the sample offering compound which dissolved mul in DMF after mixing 5 mul addition of is done and it is at 37 degrees C. For 25 minutes It put. It is an arachidonic acid (20 muM) 100 By doing mul addition of, the reaction was made to start and the amount of chemiluminescence for 10 seconds after immediately after arachidonic-acid addition was measured using Rumi Starr (Lumistar (BMG Labtechnologies GmbH)). The rate of inhibition is DMF 5. They are 100% and flurbiprofen (4 mM) 5 about the enzyme activity at the time of mul addition. The enzyme activity at the time of mul addition was calculated as 0%. The concentration (IC<sub>50</sub> value) of a sample offering compound required to check enzyme activity 50% was computed by PRISM2.01 (graph pad software company). A result is shown in Table 1.

[Table 1]

検体	COX-1阻害活性 (IC <sub>50</sub> 値)	COX-2阻害活性 (IC <sub>50</sub> 値)
化合物A	0.45 μM	0.38 μM
化合物B	2.66 μM	1.37 μM
化合物C	7.80 μM	3.70 μM

The result of Table 1 shows that compound A, and B and C have the outstanding COX inhibitory action.

[0048] Example 1 The necrosis detection approach trial compound Guinea pig gastric-mucosa primary culture cell, After carrying out processing (Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.281, G1092-G1100, 2001) for 1 hour, The survival rate of a cell A trypan blue staining technique (Dig.Dis.Sci.45, 1674-1679, 2000), Or by investigating by the MTT method (Biol.Pharm.Bull.24, 887-891, 2001), necrosis is detectable. Moreover, the check of necrosis having occurred can be



performed also by investigating damage on nuclear membrane by the following approaches. (Assay of nuclear membrane damage) Cell 0.17 mM Hoechst 33342 100 With mug/ml propidium iodide 20 After part-incubating, it observes with a fluorescence microscope. The cell which started necrosis is propidium iodide. Since it cannot discharge, a nucleus is dyed pink. By detecting necrosis by the above-mentioned approach, ED50 of a trial compound is computed, by comparing with IC50 about the COX inhibitory action of this compound, it has "COX inhibitory action and weak compound" of a necrosis induction operation can be obtained.

[0049] Example 2 After carrying out processing (Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.281, G1092-G1100, 2001) of the apoptosis detection approach compound B or the compound C to a guinea pig gastric-mucosa primary culture cell for 16 hours, apoptosis was detected from measuring the rate of cell survival by the MTT method (Biol.Pharm.Bull.24, 887-891, 2001). A result is shown in Table 2.

[Table 2]

化合物濃度	生存率 (%)	
	平均値 (n = 3) ± 標準誤差	
	化合物B	化合物C
0 mM	100 ± 3.5	100 ± 3.1
0.1 mM	-	102 ± 2.4
0.2 mM	100 ± 3.9	100 ± 5.1
0.3 mM	102 ± 1.9	106 ± 1.3
0.4 mM	100 ± 0.4	100 ± 0.6
0.5 mM	96 ± 4.9	99 ± 2.4
0.6 mM	99 ± 4.7	-
0.7 mM	99 ± 2.9	-

Moreover, the check of apoptosis having occurred can be performed also by detecting DNA fragmentation by the following approaches.

(DNA fragmentation) They are the suspension back and Proteinase K about a cell at lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.8), 10 mM EDTA, 0.5% sodium-N-lauroylsarcosinate) of 70microl. which incubates 50 degrees C by last concentration 1 mg/ml for 2 hours 50 degrees C incubates RNaseA by last concentration 0.5 mg/ml next for 30 minutes. A sample is agarose gel electrophoresis 2%. It analyzes. By detecting apoptosis by the above-mentioned approach, ED50 of a trial compound is computed, by comparing with IC50 about the COX inhibitory action of this compound, it has "COX inhibitory action and weak compound" of an apoptosis induction operation can be obtained.

[0050] Example 3 Manufacture (1) compound A of the coat lock of compound A A 10.0 g (2) lactose 60.0 g (3) corn starch 35.0 g (4) gelatin 3.0 g (5) magnesium stearate 2.0 g compound A The mixture of 10.0 g, lactose 60.0 g, and corn-starch 35.0 g is granulated through the screen of 1 mm mesh using gelatin water-solution 30 ml (considering as gelatin 3.0 g) 10% of the weight, it dries at 40 degrees C, and screening is carried out again. It mixes with magnesium stearate 2.0 g, and the granulation obtained is compressed. The main lock obtained is coated with the glycocalyx by sucrose, the titanium dioxide, talc, and the water suspension of gum arabic. Glazing of the tablet with which coating was performed is carried out by yellow bees wax, and the coat lock of 1000 locks is obtained.

[0051] Example 4 Manufacture (1) compound A of the tablet of compound A A 10.0 g (2) lactose 70.0 g (3) corn starch 50.0 g (4) soluble starch 7.0 g (5) magnesium stearate 3.0 g compound A 10.0 g and magnesium stearate 3.0 g are granulated by water-solution 70 ml (7.0 as soluble starch g) of soluble starch, and it dries and mixes with lactose 70.0 g and corn-starch 50.0 g. Mixture is compressed and the tablet of 1000 locks is obtained.

[0052] Example 5 The manufacture (1) compound B of the coat lock of Compound B A 10.0 g (2) lactose 60.0 g (3) corn starch 35.0 g (4) gelatin 3.0 g (5) magnesium stearate The mixture of 2.0 g

compound B 10.0 g, lactose 60.0 g, and corn-starch 35.0 g is granulated through the screen of 1 mm mesh using gelatin water-solution 30 ml (considering as gelatin 3.0 g) 10% of the weight, it dries at 40 degrees C, and screening is carried out again. It mixes with magnesium stearate 2.0 g, and the granulation obtained is compressed. The main lock obtained is coated with the glycocalyx by sucrose, the titanium dioxide, talc, and the water suspension of gum arabic. Glazing of the tablet with which coating was performed is carried out by yellow bees wax, and the coat lock of 1000 locks is obtained.

[0053] Example 6 The manufacture (1) compound B of the tablet of Compound B A 10.0 g (2) lactose 70.0 g (3) corn starch 50.0 g (4) soluble starch 7.0 g (5) magnesium stearate 3.0 g compound B 10.0 g and magnesium stearate 3.0 g are granulated by water-solution 70 ml (7.0 as soluble starch g) of soluble starch, and it dries and mixes with lactose 70.0 g and corn-starch 50.0 g. Mixture is compressed and the tablet of 1000 locks is obtained.

[0054]

[Effect of the Invention] The compound which has (1) COX inhibitory action, and has necrosis and/or the weak compound of an apoptosis induction operation, and (2) COX inhibitory action, and has necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action by the screening approach of this invention can be obtained efficiently. The compound which has (1) COX inhibitory action obtained by the screening approach of this invention, and has necrosis and/or the weak compound of an apoptosis induction operation, and (2) COX inhibitory action, and has necrosis and/or apoptosis induction inhibitory action is useful as a non steroid anti-inflammatory agent without an alimentary canal membrane failure, especially a gastric-mucosa failure etc.

---

[Translation done.]